Appl. Chem. Eng., Vol. 21, No. 4, August 2010, 452-456

1,3-디글리세리드의 선택적 합성에 있어서 상용 고정화 효소의 영향에 관한 비교 연구

정대원† · 조미혜

수원대학교 공과대학 신소재공학과
(2010년 5월 10일 접수, 2010년 5월 19일 채택)

A Comparative Study on the Effect of Commercialized Immobilized Lipases on the Selective Synthesis of 1,3-Diglyceride

Dae-won Chung† and Mi Hye Cho

Department of Polymer Engineering, College of Engineering, Suwon University, Suwon 400-600, Korea
(Received May 10, 2010; Accepted May 19, 2010)

최근 1,3-디글리세리드(1,3-DG)는 트리글리세리드(TG)와 대사 기구가 달라, 체지방으로 체내에 축적되지 않는 것으로 알려져 주목을 받고 있다. 본 논문에서는 고정화 리파제인 Lipozyme을 사용한 1,3-DG의 선택적 합성에 관하여 연구하였다. 글리세린과 올레인산(OA)의 몰비를 1 : 2로 고정한 후에 진공 하에서 수행한 에스테르 합성 반응에서 있어서, 반응 온도 및 리파제의 양에 따른 모노글리세리드(MG), DG, TG 및 DG 중의 1,3-DG의 함량 변화를 분석하였다. 온도가 높아질수록 또한 리파제의 사용량이 늘어날수록 OA의 감소 속도로 측정한 반응 속도는 빨랐으며, DG 함량이 최대치에 도달한 이후에는 MG, DG 및 TG의 함량에는 많은 변화가 발생하는 것을 확인할 수 있었다. Novozym을 사용하여 동일한 실험을 한 기존의 결과와 비교하였을 때, 반응성은 Novozym 쪽이 높았으나, 1,3-DG의 선택성은 Lipozyme이 월등하게 높아서, 50 ℃ 반응에서 DG 중의 1,3-DG 함량이 98%에 달했다.

It is known that 1,3-diglyceride (1,3-DG) hardly accumulates inside human body because the metabolism of 1,3-DG is entirely different from that of general fats such as triglycerides (TG). This research focuses on the selective synthesis of 1,3-DG by the esterification reaction using an immobilized lipase. For a reaction between glycerin and oleic acid (OA) with a mole ratio of 1 : 2 under vacuum, changes in the compositions of monoglyceride (MG), TG and DG and the contents of 1,3-isomers in DG were investigated, as a function of reaction temperature and the amount of lipase. The reactivities determined by the rate of the consumption of OA became higher with the increase in temperature and the amount of lipase. When the results were compared with those obtained in the earlier study where Novozym was applied as an immobilized lipase, the reactivity was higher for Novozym, on the other hand, selectivity to 1,3-DG was much higher for Lipozyme. Especially, it is remarkable that 1,3-DG content in total DG reached to 98% in the reaction carried out at 50 ℃ using Lipozyme.

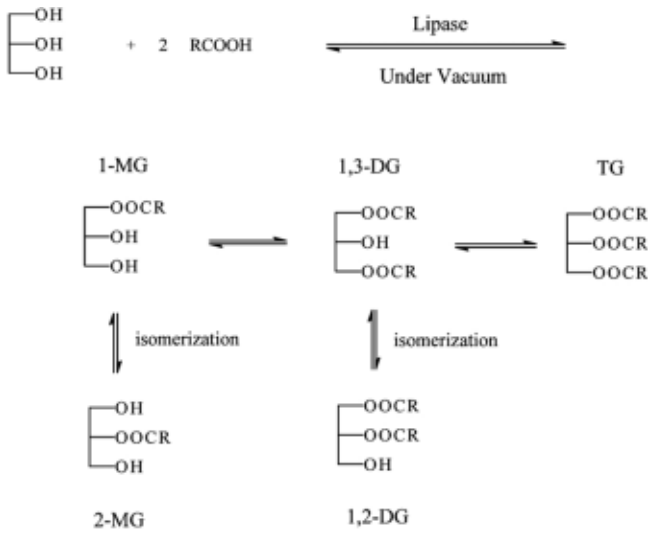
Keywords: *1,3-diglyceride, lipase, esterification, oleic acid, selective synthesis*

1. 서 론

지방(Fats) 또는 유지(oils)의 주성분인 트리글리세리드(TG)는 glycerol의 3개의 -OH 모두에 지방산이 에스테르 결합으로 연결되어 있는 물질이며, 2개가 붙어있는 디글리세리드(DG) 및 1개가 붙어있는 모노글리세리드(MG)들을 통칭하여 글리세리드(glyceride)라고 부른다. 일반적으로 MG는 비이온성 계면활성제로서의 특징을 지니고 있어서 식품, 화장품 및 의약품 공업에서 유화제로 널리 사용되고 있다[1,2]. 반면에 DG는 MG와의 혼합물 형태로 유화제로 사용되는 것[3] 이외에는 특별한 용도가 없는 이유로 많은 연구가 수행되어 오지 않았으나, 최근 위치 이성질체에 따라 DG의 대사 기구가 변화하는 것으로 알려져 주목을 받고 있다[4]. DG에는 지방산의 결합위치에 따라 1,2-DG와 1,3-DG, 2종류의 구조가 존재하는데, 2위치에 지방산이 결합되어 있지 않은 1,3-DG는 유리 지방산 형태로 완전하게 가수분해되어 체지방(TG)으로 축적되기 어려운 것으로 알려져 있다[5]. 실제적으로 1,3-DG를 다량 포함하는 식용유의 경우, 기존의 식용유(TG)에 비해 체지방 감소 효과가 있는 것으로 임상실험을 통하여 확인되었으며[6,7] 일본의 Kao에서는 세계에서 최초로 1,3-DG가 약 70% 포함되어 있는 식용유를 제품화하였다.

DG를 합성하는 가장 고전적인 방법은 TG를 부분적으로 가수분해시키는 방법[8]이나, 선택적 합성을 위해서 리파제를 사용할 경우에는 대부분의 리파제가 1,3-선택성을 지니고 있는 탓에 생성되는 DG는 대부분 1,2-이성질체이었다[9]. 또한, TG와 글리세린과의 에스테르교환반응(glycerolsis)[10-12]에 의해서 DG를 합성하는 방법이 알려져 있으나, 최근에는 리파제를 이용하여 글리세린과 지방산을 직접 에스테르화 반응시켜 1.3-DG를 선택적으로 합성하는 연구가 주로 수행되고

† 교신저자 (e-mail: dwchung@suwon.ac.kr)



Scheme 1. Lipase-catalyzed esterification reaction of oleic acid and glycerin.

있다[13-15].

리파제를 사용한 지방산과 글리세린의 에스테르화 반응은 Scheme 1에서 볼 수 있듯이 생성물의 종류가 다양하고, 또한 acyl migration에 의하여 이성질체가 생성될 뿐만 아니라, 생성물 사이에서 alcoholysis 반응까지 일어나는 매우 복잡한 기구로 진행되는 것으로 알려져 있다. 최근 저자들은 글리세린과 올레인산(OA)의 에스테르화 반응을 상용화된 고정화 리파제인 Novozym 435 (이하 Novozym으로 표기함)를 사용하여 반응 온도 변화에 따른 생성물 중의 글리세리드의 조성변화에 관하여 연구한 결과, 1,3-DG 함량이 최대 88%에 도달할 수 있다는 것을 확인하였다[16].

본 논문에서는, *Rhizomucor miehei* 유래의 효소를 음이온 교환수지에 고정화[17]시킨 Lipozyme RM IM (이하 Lipozyme으로 표기함)을 사용하여 글리세린과 OA의 에스테르화 반응에 있어서 생성물 중의 글리세리드의 조성변화에 관하여 연구하였다. 구체적으로는, 반응 온도 및 리파제의 사용량의 변화에 따른 각각의 생성물의 함량비와의 상관관계를 규명하고 반응 최적화에 관한 연구를 하였으며, Novozym을 사용하여 동일한 반응의 양상을 연구한 기존의 결과[16]와 비교하여 분석하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 기기

합성에 사용한 글리세린과 OA는 Shinyo Pure Chemical사의 제품을 사용하였고, 고정화 리파제는 Novozym A/S (Bagsvaerd, Denmark) 사의 Lipozyme RM IM (activity : 10000 PLU/g)을 사용하였다. 지방산 적정에 필요한 0.1 N-ethanolic KOH 용액은 대정화금주식회사의 제품을 사용하였고, 그 외의 시약은 알드리치 제품을 사용하였다.

고속액체크로마토그라피(HPLC) 측정은 Supelcosil LC-Si를 칼럼으로, Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)를 detector로 사용하였다. 용출 용매로는 benzene : chloroform : acetic acid (부피비로 70 : 30 : 2)를, 용출 속도는 1 mL/min의 조건으로 하였다.

2.2. 에스테르화 반응

500 mL 둥근 바닥 플라스크에 글리세린(10 g)과 OA (61.2 g)를 몰비로 1 : 2가 되도록 넣고 무용매 조건에서 일정량의 Lipozyme을 첨가하여 200 rpm의 교반속도 하에서 반응을 진행하였다. 또한, 에스테르화 반응에서 발생하는 수분을 효과적으로 제거하기 위해서, vacuum controller가 부착된 peristatic pump (NSE 800, KNF사 제조)를 사용하여 1 Torr 이하의 압력에서 반응하였다. 온도에 따른 글리세리드의 함량 변화를 알아보기 위해 리파제 양은 OA 대비 6 wt%를 첨가하고 40 ℃에서 70 ℃까지 10 ℃의 차이를 두어 온도를 바꾸어 가면서 반응을 하였다. Lipozyme의 양에 따른 글리세리드의 함량 변화를 알아보기 위해서 50 ℃에서 2 wt%, 6 wt%, 10 wt%를 넣어 반응을 하였다.

반응개시 후, 일정시간 간격으로 샘플 약 0.2 g을 채취하여 4 mL의 클로로포름을 첨가하여 여과를 함으로써 고정화 리파제인 Lipozyme을 제거하였다. Thin layer chromatography (TLC)를 통하여 반응의 진행상황을 정성적으로 확인하였으며, HPLC를 통하여 생성된 MG, TG, 1,3-DG 및 1,2-DG의 상대비를 측정하였다. 반응물 중의 글리세리드의 정량분석을 위하여 1,3-diolein, monoolein 및 triolein을 사용하여 검량선을 작성한 후에, 각각의 글리세리드의 몰%로 변환하였다.

OA의 함량변화를 알아보기 위해 일정시간 간격으로 약 0.1 g의 샘플을 채취하여 원심분리기(4000 rpm에서 4 min)를 통해 Lipozyme을 분리한 후, 위층의 생성물을 정확하게 0.5 g 취하였다. 여기에 ethanol : ether (1 : 1) 용액 20 mL을 넣고 1% phenolphtalein 용액을 한 방울 떨어뜨린 후 0.1N-ethanolic KOH 용액으로 적정하여, 반응 전의 샘플과 비교한 OA의 잔류량을 %로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 글리세리드의 분석

글리세리드 혼합물에서 각각의 글리세리드의 정량분석은 HPLC에 의해 수행하였으며, 글리세리드와 같이 점성이 있는 물질의 분석에서는 refractive index (RI) 검출기보다 정량성이 뛰어난 것으로 알려져 있는[18] ELSD를 검출기로 사용하였다. 또한, 표준물질을 사용하여 검량선을 작성한 후, HPLC 상에서 나타나는 글리세리드 각각의 피이크의 면적으로부터 정량 분석을 수행하였다. 분석과 관련한 자세한 방법은 전보[16]에 상세히 기술되어 있다.

3.2. 온도에 의한 영향

Lipozyme양을 지방산 대비 6 wt%로 고정하고, 200 rpm, 1 Torr 이하의 감압 하에서 40 ℃에서부터 Lipozyme이 활성을 나타내는 최대 온도로 알려져 있는 70 ℃까지 10 ℃ 간격으로 온도를 바꾸어 가면서 에스테르화 반응을 수행하였다. 본 반응은 OA의 소모 속도만으로 반응속도를 평가할 수 있으므로, 각각의 온도에서의 시간에 따른 OA의 함량 변화를 측정한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 온도가 높을수록 반응속도가 빨라지는 일반적인 양상을 보였으며, 40 ℃에서는 16시간이 경과하여도 약 10 mol% 정도의 OA가 남아있는 것으로 나타났으며 더 이상 경과하더라도 큰 변화가 없어, 반응이 완전하게 종료되지 않는 것으로 나타났다. 나머지 온도에서도 지방산은 완전하게 소모되지 않고 1 mol% 이내로 계속 존재하는 것으로 나타났다. 일반적으로 글리세롤 대비 지방산을 몰 기준으로 2배에서 2.5배 사용한 경우에는 미량의 지방산이 잔류한다는 기존의 연구 결과[19]와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서도 1 mol%의 OA가 잔류하는 시점을 반응의 종료점으로 표현하기로 한다.

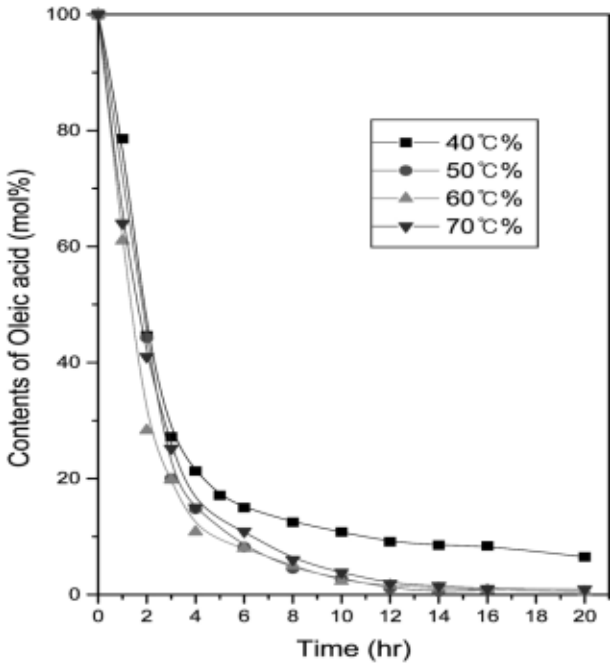


Figure 1. Relative amount of oleic acid (mole%) in esterification reactions at various temperatures at 40 ℃ (■), 50 ℃ (●), 60 ℃ (▲) and 70 ℃ (▼).

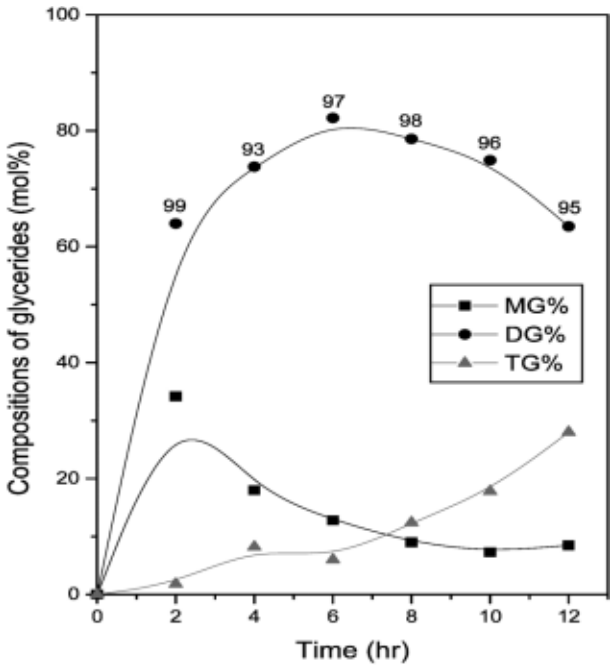


Figure 2. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reaction at 50 ℃. The values inserted mean 1,3-DG content (%) in total DG.

동일한 반응 조건하에서 Novozym을 사용한 연구[16]에서는, 50 ℃ 이상의 온도에서는 6 h 만에 반응이 종료되었으나, Lipozyme을 사용한 본 연구에서는 동일한 조건(50 ℃, 6 h)에서도 약 10 mol% 정도의 OA가 남아있으며, 40 ℃를 제외한 나머지 온도에서는 약 12 h에 반응이 종료되는 것으로 나타나, Novozym보다는 반응성이 낮은 것을 알

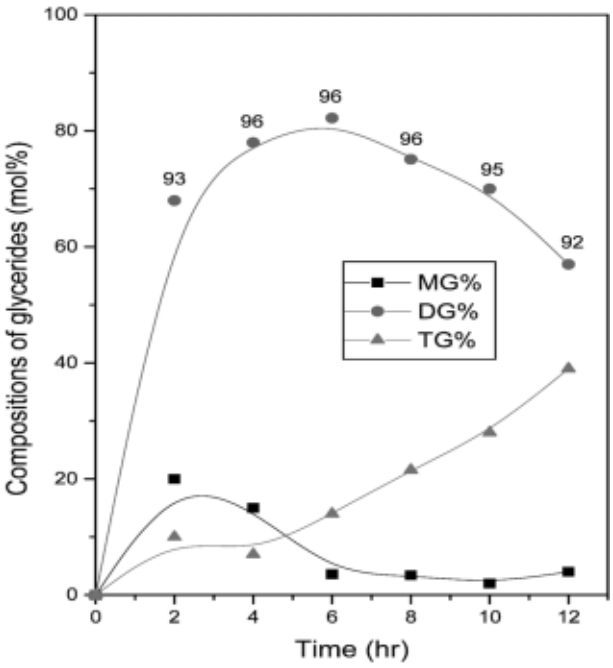


Figure 3. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reaction at 60 ℃. The values inserted mean 1,3-DG content (%) in total DG.

수 있다.

Lipozyme양을 OA대비 6 wt%로 고정하고, 200 rpm, 1 Torr 이하의 감압하에서 Lipozyme이 활성을 나타내는 최대온도인 70 ℃까지 10 ℃ 간격으로 온도를 바꾸어가면서 수행한 에스테르화 반응 혼합물 중의 글리세리드(MG, DG 및 TG)의 상대적인 함량을 나타낸 결과를 Figure 2 (50 ℃)에서 Figure 4 (70 ℃)까지 나타내었다. 40 ℃에서는 Figure 1에 나타난 것과 같이 반응이 종료되지 않았으므로 제외하였으며, 각각의 Figure에서 DG의 함량을 나타내는 표시(●) 위에 표기되어 있는 숫자는 DG 중의 1,3-DG의 함량%를 의미한다.

모든 온도에서 반응 초기에는 MG와 DG의 함량이 늘어나나, 점차 MG의 함량이 줄어들고 DG의 함량이 최대가 되는 시점에서 TG의 함량이 늘어나는 것을 알 수 있다. 이는 단순하게 OA와 반응기(-OH)가 3개인 글리세린과의 에스테르화 반응에서 한 분자의 OA가 결합된 MG가 먼저 생성되고 거기서부터 DG가, 그리고 DG로부터 TG가 순서적으로 생성된다는 관점에서 이해될 수 있다. 이는 글리세린과 지방산과의 에스테르화 반응에서 일반적으로 관찰되는 현상이다. 한편, 온도 변화에 따른 반응 양상을 검토하면, 50 ℃ (Figure 2) 및 60 ℃ (Figure 3)에서는 약 6 h 정도에서 DG 함량이 최대치에 도달하나, 70 ℃ (Figure 4)에서는 4 h 정도에 최대치에 도달하여 온도가 높을수록 최대 DG 함량에 도달하는 시간도 약간은 빨라지는 것을 알 수 있다.

최대 DG 함량에 도달한 이후에도 각각의 생성물의 함량에는 변화가 일어나며, 이는 생성된 글리세리드에 OA가 부가되는, 즉 MG가 DG로, DG가 TG로 변환되는 반응 이외에도, 생성되는 글리세리드 사이에 glycosylation (acylation, 화학적으로는 글리세리드 사이의 에스테르 교환반응)이 일어나기 때문으로 판단된다. 이와 같은 glycosylation 반응 역시 리파제에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며, 실제적으로 고정화 리파제(Novozym)를 사용하여 동일한 실험을 진행하다가 효소만 제거하고 계속 반응을 진행하더라도 더 이상 glycosylation 반응이 일어나지 않는 (즉, 글리세리드의 함량에 변화가 없는) 현상이 확인되

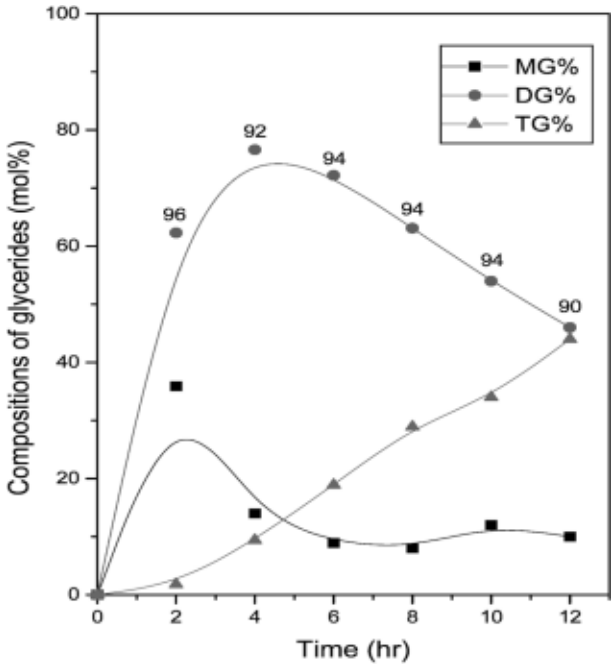


Figure 4. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reaction at 70 ℃. The values inserted mean 1,3-DG content (%) in total DG.

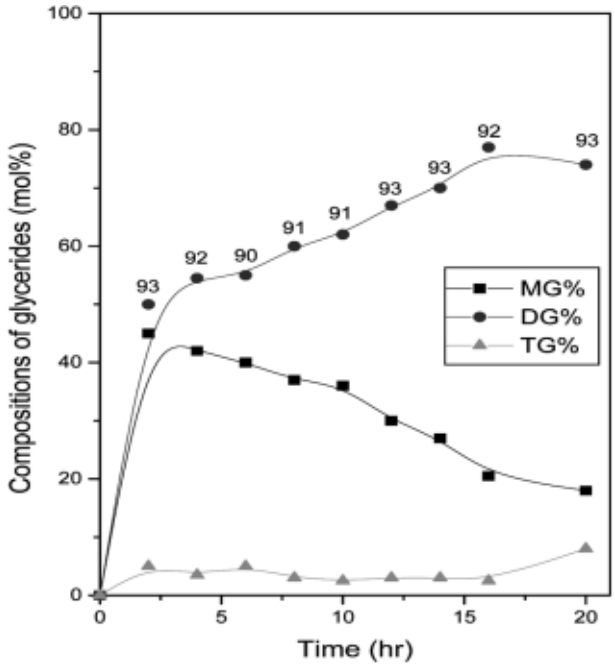


Figure 5. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reaction at 50 ℃ with lipase content of 2 wt%.

었다[16]. 본 연구에서도, Figures 2～4에서 알 수 있듯이, 전체적으로 최대 DG 함량에 도달할 때까지는 MG도 함께 증가하지만 그 후로는 DG 및 MG의 함량이 줄고 TG가 상대적으로 늘어나는 것을 알 수 있다. 또한, 온도가 높을수록 최대 DG 함량에 도달하는 시간은 빠르지만 DG의 최대 함량치는 오히려 약간 낮아지는 경향을 나타내며, DG 함량이 최대에 도달한 이후에도 역시 온도가 높을수록 DG의 함량이 급격하게 저하됨과 동시에 TG의 함량은 상대적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 이와 같은 현상은, 온도가 높을수록 에스테르화 반응 속도도 높아지지만, 이와 동시에 glycosylation 반응 속도도 높아져 일단 생성된 DG가 TG로 빠르게 전환되기 때문으로 판단된다.

한편, 생성되는 DG 중의 1,3-DG 함량은 전체적으로 반응 온도에 무관하게 90% 이상을 유지하는 것으로 나타났다. 이는 Lipozyme이 지닌 고유의 1,3-position 특이성(즉, 1,3-DG를 우선적으로 생성하는 특성)이 매우 높아 온도에 의한 영향을 크게 받지는 않기 때문으로 판단된다.

3.3. Lipozyme 양에 의한 영향

상기 결과에서 최적온도로 판단된 50 ℃로 반응온도를 고정하고, Lipozyme양을 지방산 대비 2, 6, 10 wt%로 바꾸어가면서 동일한 조건하에서 에스테르화 반응을 수행하였으며, 각각의 반응 결과를 2 wt% (Figure 5) 및 10 wt% (Figure 6)에, 6 wt%의 결과는 Figure 2에 이미 나타내었다. 먼저, Lipozyme을 OA 대비 2 wt%를 사용한 경우에는 약 16 h이 지난 후에 OA가 소멸되었으며, 10 wt%를 사용한 경우에는 6 h 이내에 OA가 완전하게 소멸되는 것으로 나타나, 효소 사용량이 높아질수록 지방산의 소모가 더 빠르다는 것을 알 수 있었다. 또한 OA가 소멸되는 시간과 DG의 함량이 최대가 되는 시점은 거의 동일한 것을 알 수 있다. 따라서 Lipozyme 양이 늘어남에 따라 최대 DG 함량에 도달하는 시간도 빠르나, 최대 DG 함량은 Lipozyme 양에 무관하게 약 80% 정도로 일정하였다.

생성되는 DG 중의 1,3-DG 함량은 반응 전반에 걸쳐 90% 이상으로

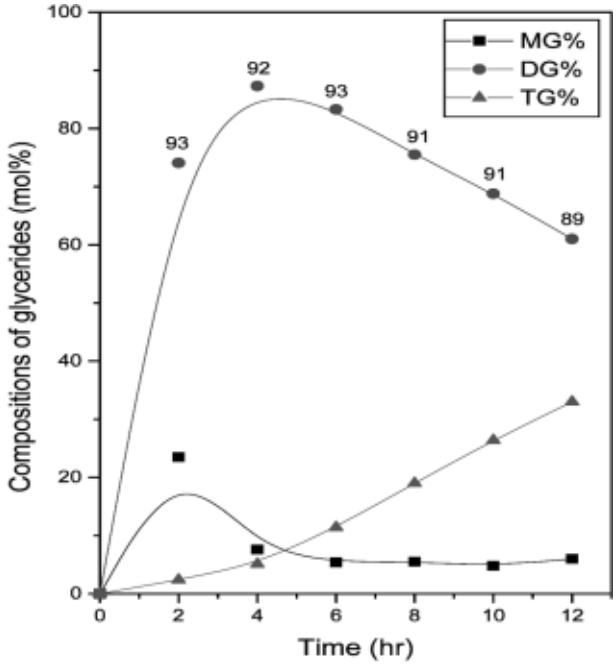


Figure 6. Compositions of MG (■), DG (●), and TG (▲) in esterification reaction at 50 ℃ with lipase content of 10 wt%.

매우 높게 유지되는 것을 알 수 있다. 이는 Novozym을 사용한 실험[16]에서는 효소의 사용량이 늘어날수록 1,3-DG의 함량이 낮아지는 현상을 나타낸 것과 매우 상이하다. 이는 Lipozyme이 지닌 고유의 1,3-position 특이성이 매우 높아 DG 중의 1,3-DG 함량의 열역학적 평형값(66%)보다도 매우 높은 상태에서 1,3-DG 함량이 유지되는 것으로 판단된다.

Table 1. Comparison of Lipozyme- and Novozym-Mediated Selective Synthesis of 1,3-DG

	Lipozyme			Novozym[c]		
	Reaction time[a]	Maximum DG content	1,3-DG content[b]	Reaction time[a]	Maximum DG content	1,3-DG content[b]
50 ℃	6 h	ca. 80 mol%	97%	4 h	ca. 70 mol%	87%
60 ℃	6 h	ca. 80 mol%	96%	2 h	ca. 70 mol%	76%
70 ℃	4 h	ca. 80 mol%	92%	2 h	ca. 60 mol%	78%

a : Reaction time taken until DG content reached maximum
b : 1,3-DG content in total DG when DG content reached maximum
c : Cited from earlier literature[16]

3.4. Lipozyme과 Novozym의 비교

Lipozyme과 Novozym은 유지화학 분야에서 다양한 물질의 합성에 적용되는 대표적인 고정화 리파제이나, 이 두 효소의 반응성/특이성을 직접적으로 비교한 예는 많지 않다. 예를 들면, 헥산으로 추출한 올리브 오일과 글리세린의 glycerolysis 반응[20] 및 sesame oil의 ethanolysis에 의해서 MG 및 DG를 합성하는 반응[21]에서는 Novozym의 반응성이 더 우수한 것으로 나타났다. 또한, 다양한 종류의 식물성 오일의 alcoholysis 반응에 의해 바이오디젤을 합성하는 연구에서는 Lipozyme을 사용하였을 때는 최대 전환률이 84%로 나타나나, 동일한 조건 하에서 Novozym은 정량적으로 바이오디젤로 전환되는 것으로 나타났다[22]. 이상의 결과를 종합하면, 반응성 측면에서는 Novozym이 Lipozyme보다 우수한 것을 알 수 있으나, 특이성 측면에서는 직접적인 비교가 어렵다.

따라서, 저자들은 지방산과 글리세린의 에스테르화 반응에 있어서의 Lipozyme과 Novozym의 반응성 및 선택성을 직접적으로 비교하기 위해서, 지방산 대비 6%의 고정화 효소를 사용하여 수행한 실험 결과를 요약하여 Table 1에 정리하였다. Table 상의 Lipozyme의 데이터는 Figures 2～4에서 얻어진 최대 DG 함량 값을 나타냈으며, Novozym의 데이터는 저자들에 의해서 동일한 조건에서 수행한 실험의 결과[16]에서부터 발췌한 것이다.

Table 1에서 알 수 있듯이, Novozym을 사용한 경우, 최대 DG 함량까지 도달하는 시간이 더 빠른 것으로 나타나, 에스테르화 반응 속도가 더 높은 것을 알 수 있다. 그러나, 최대 DG 함량 및 DG 중의 1,3-DG의 함량 모두 Lipozyme 쪽이 더 높게 나타났다. 즉, 글리세린과 OA의 에스테르화 반응 속도는 Novozym 쪽이 더 높으나, DG 선택성 및 1,3-DG 선택성은 Lipozyme 쪽이 현저하게 우수한 것을 알 수 있다. 특히, Lipozyme을 사용한 50 ℃ 반응에서 DG 중의 1,3-DG 함량이 98%에 달하는 것은 주목할 만한 결과로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 상용화된 고정화 리파제인 Lipozyme의 존재 하에서, 글리세린과 OA의 에스테르화 반응을 수행하여, DG 및 1,3-DG의 선택적 합성에 관하여 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 반응온도가 높을수록 반응속도는 빨라지며, DG 및 1,3-DG의 최대 함량은 온도가 높아질수록 약간 저하되는 것으로 나타났다.

2) DG, 1,3-DG의 최대 함량 및 반응 속도 등을 고려하였을 때, 지방산 대비 6 wt%의 Lipozyme을 사용하여 50 ℃에서 반응을 진행하는 것이 최적으로 판단된다.

3) 상업적으로 많이 사용되고 있는 또 다른 고정화 효소인 Novozym과 비교하였을 때, 반응 속도는 Novozym 쪽이 높았으나, 1,3-DG 선택성은 Lipozyme 쪽이 현저하게 높았다. 특히, 50 ℃ 반응에서 DG 중의 1,3-DG 함량이 98%에 달하는 것은 주목할 만한 결과로 판단된다.

감 사

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업(01-PJ4-PG4-01VN01-0030)의 지원을 받았으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. T. N. Kumar, Y. S. R. Sastry, and G. Laksh, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 153 (1989).
2. K. H. Jo, T. Y. Kim, S. U. Kim, N. H. Jeong, and K. D. Nam, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **5**, 99 (1994).
3. F. J. Plou, M. Barandiaran, M. V. Calvo, A. Ballesteros, and E. Pastor, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 66 (1996).
4. X. H. Meng, D. Y. Zou, Z. P. Shi, Z. Y. Duan, and Z. G. Mao, *Lipids*, **39**, 37 (2004).
5. H. Taguchi, H. Watanabe, K. Onizawa, T. Nagao, N. Goto, and T. Yasukawa, *J. Am. Coll. Nutr.*, **19**, 796 (2000).
6. K. C. Maki, M. H. Davidson, R. Tsushima, N. Matsuo, I. Tokimitsu, and D. M. Umporowicz, *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1230 (2002).
7. X. H. Meng, D. Y. Zou, Z. P. Shi, Z. Y. Duan, and Z. G. Mao, *Lipids*, **39**, 37 (2004).
8. A. Noma and B. Borgstrom, *Biochim. Biophys. Acta. Enzymol.*, **227**, 106 (1971).
9. T. Nagao, H. Watanabe, N. Goto, K. Onizawa, H. Taguchi, N. Matsuo, T. Yasukawa, R. Tsushima, H. Shimasaki, and H. Itakura, *J. Nutr.*, **130**, 792 (2000).
10. M. Berger, K. Laumen, and M. P. Schbeider, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 955 (1992).
11. Y. Isono, H. Nabetani, and M. Nakajima, *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 170 (1995).
12. M. Mohamed, T. Uwe, and D. Rolf, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 703 (1998).
13. R. Rosu, M. Yasui, Y. Iwasaki, and T. Yamane, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 839 (1999).
14. D-w. Chung, J. H. Song, and M. J. Baek, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **16**, 731 (2005).
15. M. Sugiura, M. Shimizu, N. Yamada, and Y. Yamada, W.O. Patent 9,909,119 (1999).
16. D-w. Chung and M. H. Cho, *J. Korean Ind Eng. Chem.,* **20**, 443 (2009).
17. S. N. Ko, H. Kim, K. T. Lee, T. Y. Ha, S. H. Chung, S. M. Lee, and I. H. Kim, *Food Sci. Biotechnol.*, **12**, 253 (2003).
18. B. Marcato and G. Cecchin, *J. Chromatogr. A*, **730**, 83 (1996).
19. Z. Guo and Y. Sun, *Food Chem.*, **100**, 1076 (2007).
20. S. F. Dias, A. C. Correia, F. O. Baptista, and M. M. R. da Fonseca, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **11**, 699 (2001).
21. M. Criado and C. Otero, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **112**, 246 (2010).
22. E. H. Martin and C. Otero, *Bioresource Technol.*, **99**, 277 (2008).