

Lipase와 유기용매를 이용한 Castor 오일의 가수분해

전 규 중 · 허 병 기 · 양 지 원
¹인하대학교 공과대학교 화공 · 고분자 · 생물공학부
한국과학기술원 화학공학과 생물환경공학 연구실
(접수 : 1999. 12. 1., 게재승인 : 1999. 12. 17.)

Hydrolysis of Castor Oil with Lipases and Organic Solvents

Gyu-Jong Jeon, Byung-Ki Hur¹, and Ji-Won Yang[†]

¹School of Chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Dept. of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701, Korea
(Received : 1999. 12. 1., Accepted : 1999. 12. 17.)

The enzymatic hydrolysis of Castor oil for the mass production of ricinoleic acid was studied to find out the optimum conditions such as solvents and the weight ratio of substrate to enzyme. Three different lipases were tested for the hydrolysis of castor oil: lipase from Porcine Pancrease(lipase PP), lipase from *Candida cylindracea*(lipase CC), lipase from *Candida Rugosa*(lipase CR). The poor mass transfer in water caused a low degree of hydrolysis of castor oil. To overcome this problem, organic solvents were used. Among organic solvents tested, hydrophobic solvents gave better results of hydrolysis than hydrophilic solvents. Organic solvents also lowered or changed the effect of pH. Isopropyl ether made complete hydrolysis of castor oil. The ratio of water to isopropyl ether and the ratio of weight ratio of lipase to castor oil were important for the hydrolysis of castor oil. At 30°C castor oil was completely hydrolyzed by 4 wt% of lipase in the mixture of isopropyl ether and water(1:1 in volume).

Key Words : hydrolysis, castor oil, lipase, organic solvent

서 론

산업적인 견지에서 fatty acid의 생산은 매우 중요하다. fatty acid는 계면활성제, 비누, 고무, 페인트, 광택제 등의 원료로 사용되며, 기타 산업에서 수요가 증가하고 있다(1). Lipid의 가수분해로부터 생산되는 glycerol의 경우도 화장품과 의약품에 사용되며, glycerin ester 또한 식품산업에서 쓰이고 있다.

상용화된 fat splitting process는 전통적으로 Twitchell process나 Colgate-Emery process와 같은 화학적 방법을 사용하여 저압 또는 중간 정도의 압력에서는 촉매를 사용하고 고압에서는 촉매 없이 고전압 등을 이용하고 있다(2). 하지만 이러한 화학적인 공정들은 고온·고압의 격렬한 반응조건하에서 이루어지기 때문에 fatty acid의 이성질화나 산화가 일어나고, 거대한 자본금과 고온·고압의 반응조건을 유지하기 위해서 많은 양의 에너지를 소모하는 등의 단점을 가지고 있다(3-4). 이와 같은 화학공정과는

달리 온화한 반응조건인 bioreactor를 이용한 fat와 oil의 가수분해에 대해서 많이 연구되고 있다. 효소에 의한 가수분해는 일찍부터 알려져 왔지만(5), 많은 기간동안 화학적 공정에 뒤져 있었다. 효소공학과 효소 반응기의 개발에 힘입어 점증적으로 이러한 현상은 바뀌어 가고 있다.

효소를 이용한 공정의 장점은 에너지의 소모가 적고, 열에 의한 산화가 적어 제품의 품질관리가 수월하며, 온도에 민감한 물질의 생산에 유리하며, 효소의 기질특이성에 의하여 특별한 물질을 복잡한 과정 없이 용이하게 생산할 수 있으며, 분리과정 역시 단순한 경우가 많다.

Lipase는 fatty acid의 triglyceride를 가수분해하는 효소(6-12)로서 산업계에서 널리 쓰이고 있는 효소(11)로서 triglyceride의 가수분해 외에도 다양한 분야에서 사용되고 있다. Lipase는 췌장, 혈장, 침, 채액, 우유, 식물, 박테리아 등 다양한 곳에서 얻을 수 있으며, pancreatic lipase가 가장 많이 연구되어 있으며, 생물공학의 도움을 받아 microbial lipase가 생산되어 가수분해에 쓰이고 있다. Microbial lipase는 생산단가가 낮고, 생산조건과 생산시간이 간단하고 짧기 때문에 대량으로 생산할 수 있기 때문에 가수분해에 사용되고 있다(11).

피마자유는 고대 인류의 역사와 함께 알려져 온 비식용성인

[†]Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering, KAIST, 373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701, Korea
Tel : 042-869-3964, Fax : 042-869-3910
E-mail : jwyang@cais.kaist.ac.kr

식물성 오일로서 다양한 용도로 사용되어 왔으며 많은 유용한 화학물질 및 유도체의 원료가 되는 산업용 오일이며, 소수성의 약품의 약물전달에도 사용되는 등 중요한 역할을 하고 있다. 피마자유는 대부분이 ricinoleic acid(탄소수 18 개, 약 90%)의 triglyceride 형태로 되어 있다. 피마자유의 전처리 공정에 대해서는 다양한 연구가 진행되어 왔는데, 그 중에서도 triglyceride를 형성하는 ester결합을 분해하여 지방산이나 지방산 ester를 생산하는 방법으로 가수분해와 monohydric alcohol을 이용한 esterfication를 들 수 있다. 가수분해하는 방법으로는 산처리 방법, 효소를 이용한 분해(13-14), 화학 촉매를 이용하는 방법 등이 알려져 있으며, 이 중 화학 공정을 이용하여 지방산을 생산할 경우 높은 에너지의 소모, 필요한 특수 시설에 따른 큰 설비 투자와 부지가 요구된다. 또한 지방산의 품질 저하 및 폐수로 인한 환경 문제 등이 발생하게 된다. 이에 비해서 lipase 등에 의한 지방산 생산 기술의 경우 에너지 비용이 절감되고 공정 설비비와 부지비 역시 감소되며 지방산의 품질을 향상시키고 작업 환경을 개선할 수 있는 장점이 있는 반면 가수분해가 불완전할 수 있으며, 효소의 가격이 비싸다는 단점이 있다.

본 연구에서는 이러한 사실을 배경으로 triglyceride의 위치선택성이 없는 상용화된 lipase를 대상으로 triglyceride의 형태인 피마자유를 완전가수분해하여 ricinoleic acid를 대량생산하기 위한 공정을 개발하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에서 사용한 피마자유는 Aldrich사의 제품을 사용하였다. 가수분해에 사용한 lipase는 lipase from Porcine Pancrease (lipase PP), lipase from *Candida cylindracea*(lipase CC), lipase from *Candida Rugosa*(lipase CR)를 사용했으며 모두 Sigma사로부터 구입하였다. 가수분해에 사용된 THF, chloroform, 1, 4-dioxane, hexane, heptane, cyclohexane, isoprpyl ether, methanol, ethanol, 2-propanol 등의 유기용매는 Merk, Junsei, Aldrich 등 다양한 회사로부터 구입했으며, 사용전 단순 증류를 통해서 정제하였다. 적정에 사용된 KOH는 Junsei 사의 제품이며, Shinyo Pure chemicals Co. 사의 phenolphthalein을 지시약으로 사용하였다.

피마자유의 가수분해

약 0.5 g의 피마자유와 10 mL의 증류수가 담긴 50 mL의 삼각플라스크에 각각 실험조건에 따라 lipase와 유기용매를 첨가하고, 하루동안 진탕배양기를 이용하여 30℃, 200 rpm의 조건으로 일정시간 교반하였다.

효소의 양에 의한 영향을 알아보기 위한 실험에서는 lipase from *Candida cylindracea*(lipase CC, 860 units per mg at pH 7.2 and 37℃ for oilve oil hydrolysis)를 기준으로 동일한 units가 되도록 lipase from porcine pancrease(lipase PP, 220 units per mg at pH 7.7 for oilve oil hydrolysis)와 lipase from *Candida Rugosa*(lipase CR, 746 units per mg, at pH 7.2 and 37℃ for oilve oil hydrolysis)의 양을 조절하고, 다른 조건은 동일하게 적용하였다.

가수분해도의 측정

Ethanol과 acetone의 혼합물(1:1, 부피비)을 20 mL를 첨가하여 가수분해를 정지시킨 후, phenolphthalein용액(0.05 g을 50 mL ethanol에 녹인 후 50 mL의 증류수를 첨가함)을 0.1 mL 첨가한 후 0.2N KOH 용액으로 적정하였다(15). 아래의 식 1을 사용하여 가수분해도를 계산하였다.

Hydrolysis of Castor oil(%) =

$$\frac{Acid\ Value}{Saponification\ Value} \times 100(\%) \quad (1)$$

Saponification value 측정

1.4005 g의 피마자유를 20 mL의 ethanol에 녹인 후, 0.5200 g의 potassium hydroxide를 첨가하고 30분 동안 oil bath를 이용하여 reflux하였다. 반응 혼합물을 상온으로 식힌 뒤 증류수 20 mL를 첨가하고 phenolphthalein을 지시약으로 사용하여 0.2 N KOH과 0.2 N H₂SO₄ 용액으로 적정하였다(16). 실험을 통하여 계산된 saponification value는 214.1 mg KOH per 1 g castor oil(3.815 mmol KOH/g castor oil)로 세 번 실험한 결과의 평균 값이다.

결과 및 고찰

lipase에 의한 피마자유의 가수분해

Castor oil의 가수분해에 사용된 Lipase CR, lipase CC, lipase PP는 많이 연구되고 있는 효소이며 가수분해 외에도 다양한 유기반응에 대해서 가능성이 연구되고 있다(17-18). 특히 lipase CR 및 lipase CC는 triglyceride의 가수분해에 있어서 기질특이성이 낮고 활성이 높기 때문에 피마자유의 가수분해에 적합한 효소로 판단하였다.

Lipase 10 mg과 10 mL 증류수에서 0.5 g의 피마자유를 30℃, 200 rpm에서 하루동안 교반하였을때 가수분해도는 30~40%로 효율이 낮았다. 반응물의 성상이 피마자유의 용해도가 극히 낮아 상분리가 일어나고, 뿌옇게 emulsion을 생성하였다. 형성된 emulsion 때문에 lipase와 파마자유, ricinoleic acid 간의 mass transfer가 원활히 일어나지 않아 가수분해도가 낮은 것으로 판단하고, emulsion이 형성되지 않도록 castor oil의 용해도가 높은 유기용매를 사용하여 가수분해도를 비교하여 보았다(Figure 1, 2).

lipase에 의한 피마자유의 가수분해에 미치는 유기용매의 영향

증류수에서의 실험에서와 같이 10 mg lipase를 사용하고, 10 mL의 증류수와 10 mL의 유기용매를 30℃, 200 rpm에서 하루동안 교반하였다. 물에 대한 용해도가 높은 용매(Figure 1)와 물과 섞이지 않는 용매(Figure 2)를 대상으로 피마자유의 가수분해실험을 하였다. 물과 잘 섞이는 용매(Figure 1)의 경우 가수분해도가 매우 낮았다. 또한 반응혼합물의 성상도 용매에 따라 정도는 다르지만 상분리가 일어났으며(data not shown), 상분리된 정도와 가수분해도와는 아무 상관관계가 없었다. Figure 1의 용매와는 달리 Figure 2의 물과 섞이지 않는 용매의 경우 chloroform을 제외하곤 대체적으로 가수분해도가 Figure1의 용매보다 높았다. 이 중 isoprpyl ether를 사용한 경우에 가수분해도가 가장 좋았다. lipase는 protease와는 달리 일반적으로 polarity가 낮은 용매

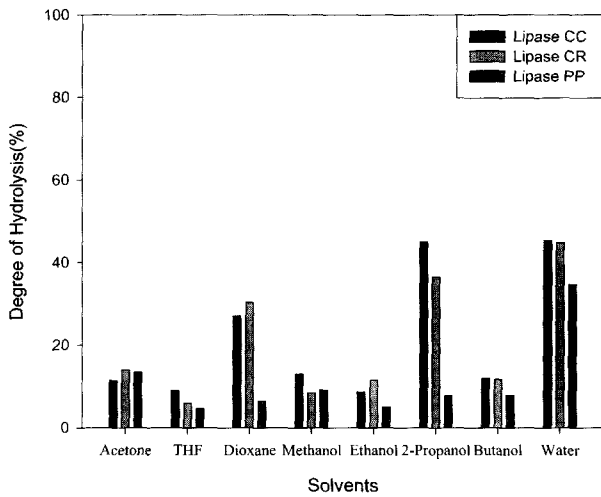


Figure 1. Solvent effect to hydrolysis of castor oil by lipases I(10 mL of solvent, 10 mL water, 10 mg of lipase, 30°C, 200 rpm, 24 hr).

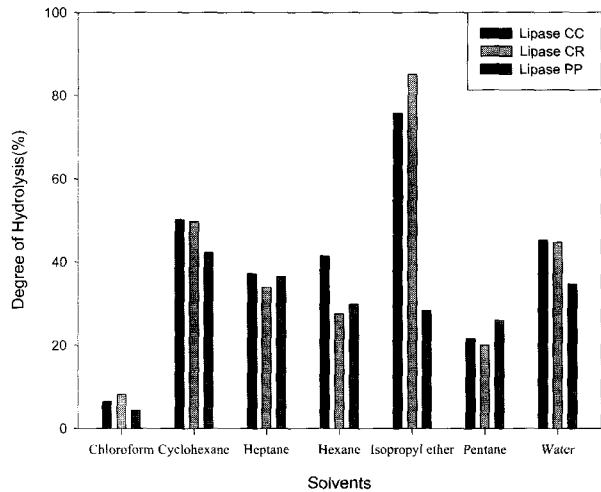


Figure 2. Solvent effect to hydrolysis of castor oil by lipases II(10 mL of solvent, 10 mL water, 10 mg of lipase, 30°C, 200 rpm, 24 hr).

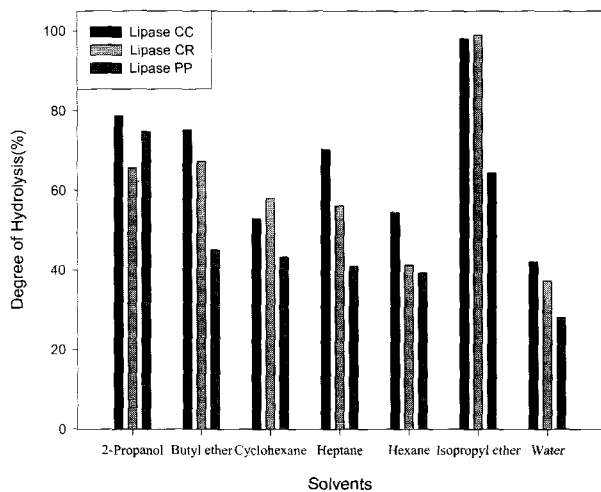


Figure 3. Solvent effect to hydrolysis of castor oil by lipases with same units(10 mL of solvent, 10 mL water, 30°C, 200 rpm, 24 hr, 20 mg of lipase CC, 23 mg of lipase CR, 78.2 mg of lipase PP).

에서 활성이 높고 오래 유지되는 것으로 알려져 있고, Laane et al.(19)의 연구결과에서도 나타났듯이 polarity가 높은 alcohol과 dioxane, THF, acetone 등에서는 가수분해도가 낮은 반면, polarity가 낮은 hexane이나 isopropyl ether에서 가수분해도가 높았다. 본 연구에서 사용한 물과 섞이는 극성이 높은 유기용매(Figure 1)의 경우 효소의 활성을 저해한 것으로 판단된다. Figure 2에서 사용한 유기용매의 효과가 mass transfer의 증대 효과인지를 확인하기 위해서는 좀더 연구가 필요하다.

Figure 3은 lipase CC의 양을 20 mg으로 늘리고, olive oil의 가수분해에 대한 활성을 기초로 동일한 units가 되도록 lipase CR과 lipase PP를 23 mg, 78.2 mg을 사용하여 하루 동안의 가수분해도를 비교한 결과이다. Figure 3에서 보듯이 증류수만의 결과는 거의 변화가 없는 반면, 유기용매를 사용한 경우 가수분해도가 전반적으로 증가하였고, isopropyl ether의 경우 lipase CC와 lipase CR을 사용했을 때 피마자유가 거의 모두 가수분해된 결과를 얻었다. 하지만 효소의 사용량이 증가한 만큼 가수분해도가 급증하지는 않았다. Figure 3에는 보이지 않았지만, Figure 1에서 사용한 용매의 대부분은 효소의 양이 늘어도 가수분해도가 Figure 2의 용매만큼 크게 증가하지 않았다. 효소 양의 증가에도 증류수에서는 가수분해도가 증가가 없는 반면, 효소의 활성에 영향을 미치는 유기용매를 사용한 경우에는 가수분해도가 증가하였다. 유기용매는 효소 주위의 mass transfer와 효소 활성에 모두 영향을 미치기 때문에, 효소의 활성과 mass transfer의 영향을 정확하게 비교하기 위해서는 좀 더 연구가 필요하다고 생각된다.

pH와 유기용매의 영향

유기용매를 사용한 상태에서 pH의 영향을 관찰하기 위해 0.1 M citric acid/0.2 M Na₂HPO₄ buffer를 사용하여 pH 3에서 8까지의 범위에서 lipase CC 20 mg을 기준으로 lipase CR과 lipase PP를 동일한 units가 되도록 조절하여 하루동안 교반한 후 가수분해도를 비교하였다(Figure 4, 5, 6). 유기용매를 사용한 경우가 사용하지 않은 경우보다 대체적으로 세 효소 모두 가수분해도가 높았다. 용매와 효소의 조합에 따라 차이는 있지만 대체 중성영역에서 가수분해도가 상대적으로 높았고, 가수분해도의 pH 의존성에서도 차이가 있음을 확인하였다. 유기용매 중에서는 isopropyl ether를 사용한 경우가 가수분해도가 가장 높았지만, pH를 조절된 경우가 조절하지 않은 경우(Figure 3)보다 오히려 가수분해 효율은 낮았다. 또한 피마자유에 있어 용매를 사용함으로써 pH의 영향을 줄이거나 바꿀 수 있고, 결과적으로 pH를 조절하지 않아도 됨을 확인하였다. 유기용매 중 isopropyl ether가 매우 유용한 용매임을 확인하였고, lipase PP는 전반적으로 가수분해도가 다른 두 효소에 비해 낮았다. 이후의 실험에서는 lipase CC와 lipase CR과 isopropyl ether만을 사용하였다.

Isopropyl ether와 물의 비율의 영향

최적부피의 물과 isopropyl ether를 사용하여 피마자유를 가수분해하기 위해서 물과 isopropyl ether 양의 변화에 따른 가수분해도의 변화를 측정하였다. lipase CC와 lipase CR 20 mg에 대해서 isopropyl ether와 물의 부피를 변화시키며 하루동안 30°C, 200 rpm에서 교반한 후 가수분해도를 확인하였다. Figure 7은 물의 부피변화에 따른 가수분해도의 변화로서, 물 7 mL를 사용

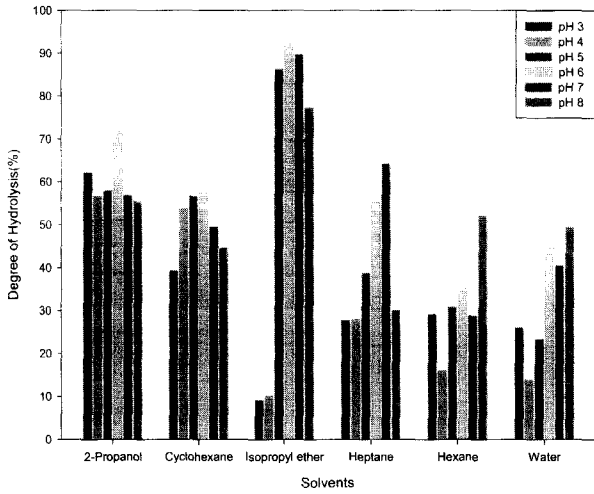


Figure 4. pH effect to hydrolysis of castor oil by lipase CC(10 mL of solvent, 10 mL water, 30°C, 200 rpm, 20 mg of lipase CC, 24 hr).

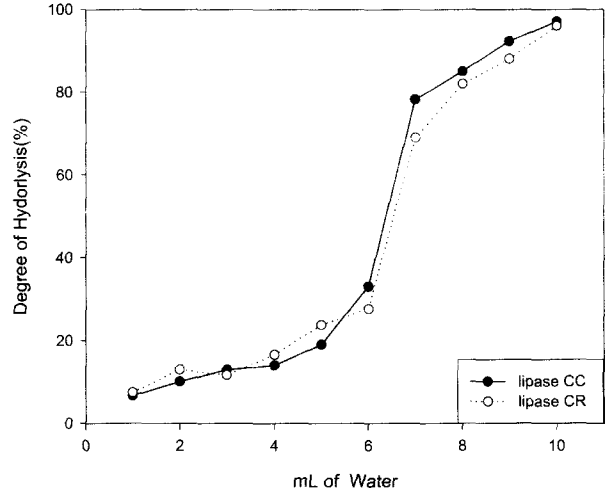


Figure 7. Effect of water content to hydrolysis of castor oil(10 mL isopropyl ether, 20 mg lipase, 30°C, 200 rpm, 24 hr).

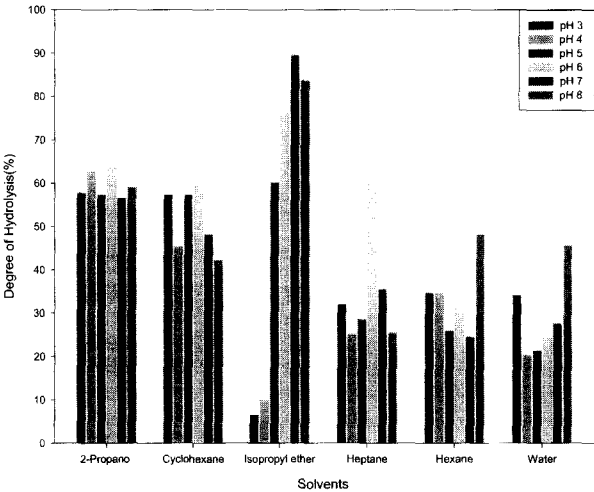


Figure 5. pH effect to hydrolysis of castor oil by lipase CR(10 mL of solvent, 10 mL water, 30°C, 200 rpm, 23 mg of lipase CR, 24 hr).

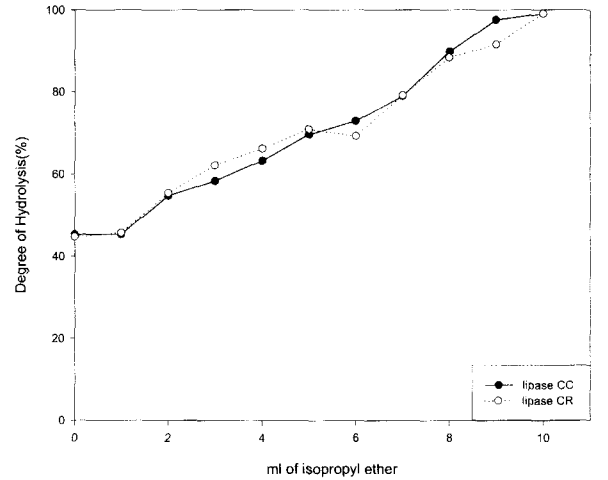


Figure 8. Effect of isopropyl ether content to hydrolysis of castor oil(10 mL water, 20 mg lipase, 30°C, 200 rpm, 24 hr).

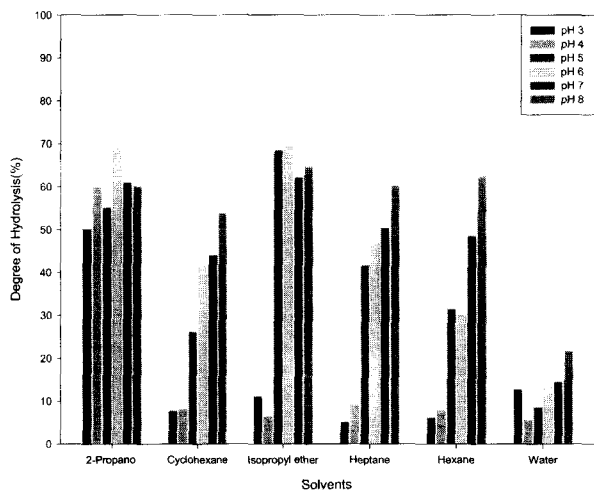


Figure 6. pH effect to hydrolysis of castor oil by lipase PP(10 mL of solvent, 10 mL water, 30°C, 200 rpm, 78.2 mg of lipase PP, 24 hr).

할 때까지 가수분해도가 증가하지 않다가 갑자기 증가한 사실을 보여 주고 있다. 반면 isopropyl ether를 증가시킨 경우(Figure 8)에는 isopropyl ether의 양이 증가할수록 가수분해도가 점진적으로 증가하였다. isopropyl ether의 경우에는 양의 증가가 효소의 활성을 증가시키기 보다 mass transfer를 증가시켜 가수분해도가 점진적으로 증가한 것으로 판단된다. 물의 양이 증가함에 따라 급격히 가수분해도가 증가하는 것은 이상계(二相系)에서 일어나는 가수분해의 평형이 이동한 것으로 해석된다. 두 실험에서 10 mL의 물과 isopropyl ether를 사용하는 것이 0.5 g의 피마자유를 완전가수분해하는 데 필요함을 알 수가 있었다.

시간과 온도에 따른 가수분해도의 변화

Figure 9는 lipase CC 20 mg, isopropyl ether 10 mL, 증류수 10 mL를 사용했을 때 30°C, 200 rpm에서 시간에 따른 가수분해도의 변화를 보인 것이다. 초기 5시간까지는 급격히 가수분해도가 증가하다가 24시간에 도달해야만 가수분해가 완전히 끝남을 확인하였다. Table 1은 lipase CR과 lipase CC를 20 mg 씩, 각각 10 mL의 isopropyl ether와 물을 사용하고 200 rpm에서 온도에

Table 1. The degree of hydrolysis of castor oil by lipase for 12 hr(10 mL isopropyl ether, 10 mL water, 20 mg lipase, 0.5 g castor oil, 200 rpm).

	30℃	35℃	40℃
Lipase CC	73%	78%	82%
Lipase CR	69%	75%	78%

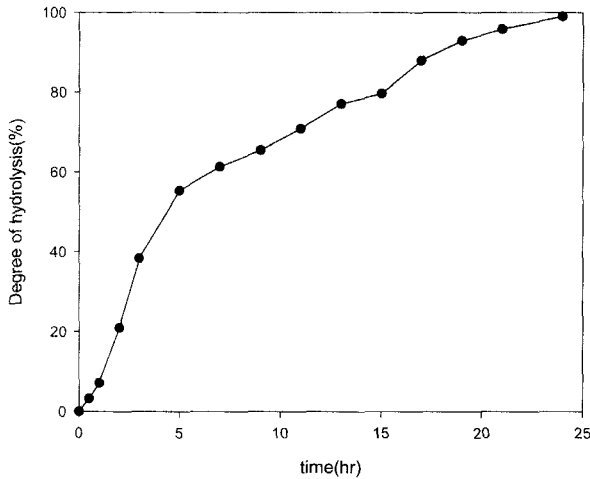


Figure 9. The change of the degree of hydrolysis by lipase CC with time(10 mL of isopropyl ether, 10 mL of water, 20 mg of lipase CC, 30℃, 200 rpm).

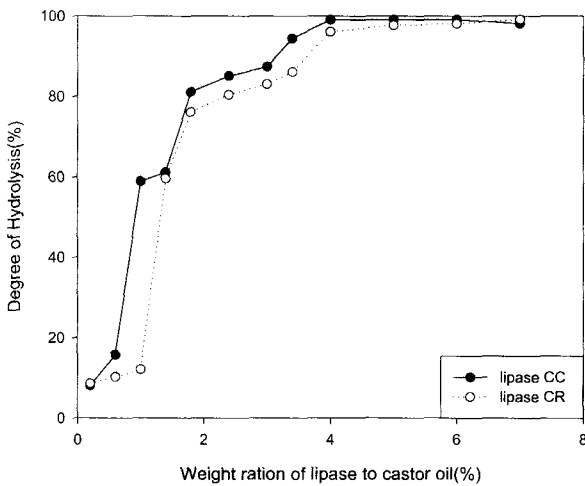


Figure 10. The change of the degree of hydrolysis of castor oil with the amount of lipases(10 mL of isopropyl ether, 10 mL of water, 30℃, 200 rpm).

따라 12시간 교반한 후의 가수분해도를 정리한 것이다. 온도가 증가함에 따라 가수분해도도 증가하였다. 40℃에서는 lipase CC의 경우 피마자유의 82%가 가수분해되어 가수분해 속도가 매우 증가한 것을 알 수 있었다. 그러나, isopropyl ether의 b.p.가 68℃이고, 휘발성이 강해 온도를 올리는 것은 위험하므로 반응속도는 느리지만 30℃에서 연구를 수행하였다.

효소의 양과 피마자유 양의 영향

효소의 양에 따른 가수분해도를 비교하기 위해 물과 isopropyl

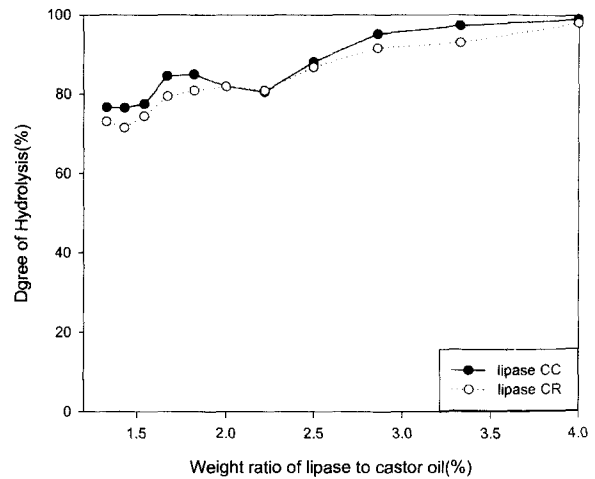


Figure 11. The change of the degree of hydrolysis of castor oil with the amount of castor oil(10 mL of isopropyl ether, 10 mL of water, 20 mg of lipases, 30℃, 200 rpm).

ether의 1:1 혼합물 20 mL에 0.5 g의 피마자유를 첨가하고, 다양한 효소 양에 대해 24 hr 후의 가수분해도를 측정하였다(Figure 10). 동일한 무게를 사용했기 때문에 lipase CR의 가수분해도가 lipase CC의 가수분해도보다 낮았다. 효소의 양이 작은 경우 두 lipase 간의 가수분해도 차이가 컸지만, 효소의 양이 늘어날수록 차이가 작아졌다. 10 mg의 lipase 즉 2 wt%의 lipase를 사용했을 경우 하루동안 약 80%의 피마자유가 가수분해되며, 20 mg, 4 wt%의 lipase를 사용했을 경우 24 hr 후 피마자유가 완전히 가수분해되는 것을 확인하였다. Figure 11은 lipase를 20 mg으로 고정시키고 피마자유의 양을 변화시키면서 가수분해도를 측정 한 결과이다. 1.0 g의 피마자유의 경우 lipase가 2 wt%에 해당하는 경우로 가수분해도가 82%로 Figure 10의 결과와 유사하였다. Figure 11의 결과는 20 mL의 isopropyl ether와 물 1:1에서 이루어진 것이므로 피마자유의 가수분해에 있어서 물과 용매의 영향(종류와 부피) 외에도 효소와 피마자유와의 무게 비도 중요한 인자임을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 lipase를 이용해서 ricinoleic acid를 대량생산하기 위해 피마자유의 완전가수분해 조건을 찾고자 하였다. 널리 알려진 lipase CR, lipase CC, lipase PP를 대상으로 피마자유의 가수분해의 가능성을 시험하고, 유기용매를 사용함으로써 가수분해도를 향상시킬 수 있음을 확인하였다. 일반적으로 lipase의 활성을 감소시키는 극성용매의 경우 피마자유의 가수분해에 있어서도 효소의 활성을 감소시켰고, 물과 섞이지 않는 hydrophobic solvent가 피마자유의 가수분해도를 크게 증가시키는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 isopropyl ether의 효과가 가장 크며, 조건에 따라 가수분해도를 두 배 이상 증가시킨다는 것을 확인하였다. 그리고 유기용매를 사용함으로써 pH의 영향을 바꾸거나 감소시킬 수 있다는 사실도 확인하였다. 용매와 물의 부피비에 의해서 가수분해가 영향을 받는다는 사실과 특히 유기용매보다는 물의 양에 절대적으로 영향받는다라는 사실을 발견하였다. 하지만, 물과 유기용매의 부피비와 함께 lipase와 피마자유의 무게 비도

매우 중요하다는 것을 확인하였다. 30℃에서 isopropyl ether를 사용할 경우 무게 비로 2 wt%일 때는 약 82%, 4 wt% 이상의 lipase CC나 lipase CR을 사용하면 피마자유가 완전히 가수분해되는 사실을 발견하였다.

REFERENCES

1. Bailey, A. E. (1982), *Bailey Industrial Oil and Fat Products*, Vol.2, 4th ed., p385, Wiley, New York.
2. 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.
3. Linfield, W. M. (1988), Enzymatic fat splitting, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 131-132.
4. Yamamoto, K, and Fujiwara N. (1995), The Hydrolysis of Castor-oil Using a Lipase from *Pseudomonas* sp, F-B-24 - Positional and Substrate-Specificity of the Enzyme and Optimum Reaction Conditions, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **59**, 1262-1266.
5. Connstein, W., Hoyer, E. and Wartenberg, H. (1902), *Ber.*, **35**, 3988.
6. Tahoun, M. K., M. F. El-Kadey and A. A. Wahba (1987), Hydrolysis of synthetic and natural triglycerides by an intracellular lipase from *Aspergillus niger*, *FETT-WISS. Technol.*, **89**, 261-263.
7. Brockerhoff, H. and Jensen, R. G. (1974), *Lipolytic Enzymes*, Academic Press, New York.
8. Thuren, T., P. Sisson, M. Waite (1990), Hydrolysis of lipid mixtures by rat hepatic lipase, *Biochem. Biophys. Acta*, **1046**, 178-184.
9. Prazeres, D. M. F., F. Lemos, F. A. P. Garcia, and J. M. S. Cabral (1993), Modeling lipolysis in a reversed micellar system: Part I. Conventional batch reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 759-764.
10. Kolossvary, G. J. (1996), Optimization of lipase activity from *Rhizopus* sp. in triglyceride hydrolysis using a modified simplex method, *Process Biochem.*, **31**, 595-600.
11. Woolley, P., S. B. Petersen (1994), *Lipases*, Cambridge University Press, New York.
12. Macrae, A. R. (1983), Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 291.
13. Bradoo, S., Saxena R. K. and Gupta, R. (1999), Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp., *World J. Microb. Biot.*, **15**, 97-102.
14. Sharon, C., Nakazato, M., Ogawa, H. I. and et al. (1998), Lipase-induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **21**, 292-295.
15. Sharon, C., Furugoh, S. and et al. (1998), Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **20**, 304-307.
16. Toivo, J., Piironen, V. and et al. (1998), Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation, *Chromatographia*, **48**, 745-750.
17. Kimura, Y., A. Tanaka, K. Sonomoto, T. Nihira and S. Fukui (1983), Application of immobilized lipase to hydrolysis of triglyceride, *Eur. J. Appl. Biotechnol.*, **17**, 107-111.
18. Bisht, K. S., Y. Y. Svirkin, L. A. Henderson, and R. A. F. Gross (1997), Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Trimethylene Carbonate, *Macromolecules*, **30**, 7735-7742.
19. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C. (1987), Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic solvents, *Biotech. and Bioeng.*, **30**, 81-87.