

유기용매계에서 Lipase에 의한 Fructose Ester의 합성

신영민 · 이상욱 · 이재동 · 이태호*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

유기용매계에서 lipase AK를 사용하여 당 ester화합물을 합성하였다. 유기용매로는 당의 용해도가 높고 반응성이 뛰어난 pyridine을, acyl donor로는 vinyl butyrate을 선택하였다. Transesterification반응에 의해 생성된 monobutryl fructose와 dibutryl fructose는 TLC 및 GC분석으로 확인하였다. Transesterification에 미치는 반응조건은 fructose:vinyl butyrate의 비가 1:10(M/M), 반응온도 40°C, 교반속도 150 rpm, 효소량 10 mg/ml의 경우가 적당하였으며 반응시간이 길어질수록 전환율이 높아져, 반응 10일 정도에서 전환율은 90%이상에 도달하였다. 이때 반응 초기에는 monobutryl fructose가 주로 합성되었으나 시간이 경과함에 따라 dibutryl fructose의 함량비가 증가하였다. 반응계에 소량의 수분을 첨가하였을 경우에는 반응속도가 감소함과 동시에 반응산물중 dibutryl fructose의 양은 줄어들고 monobutryl fructose의 생성량이 증가하는 경향을 보여주었으며, 수분함량 1%에서는 monobutryl fructose만이 생성되었다.

KEY WORDS □ Sugar ester, transesterification, lipase AK, butryl fructose ester

최근 들어 효소반응이 수계이외의 용매계, 즉 aqueous-organic system, 단일 또는 복합 유기용매와 같은 특수환경에서도 잘 일어날 뿐만 아니라, 그것도 수용액 중에서 나타내는 기질 특이성과는 다른 양상의 반응을 촉매 한다는 사실이 속속 보고되고 있어 관심의 대상이 되고 있다(3,8). Zaks 등은 99%의 유기용매에서 lipase가 tributyrin과 heptanol을 기질로 하여 transesterification에 의해 ester화합물을 합성한다고 하는 사실을 발견하여 효소의 특수기능을 입증하고 있다(26). 효소반응에 있어서 물은 효소의 촉매활성을 위한 입체구조의 유지에 관여할 뿐만 아니라 활성발현에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그러나 물은 단지 효소의 구조형성에 필요하며 그것도 효소전체 혹은 활성부위를 둘러쌀 수 있는 매우 얇은 층, 즉 monolayer의 형성에만 필요하며 효소의 촉매기능의 발휘에는 별다른 영향을 미치지 않는다고 보고하고 있다(9). 따라서 이러한 사실은 효소에 필요불가결한 최소한의 물을 제공할수있고, 효소의 실활이 수반되지 않는 어떤 종류의 용매계에서라도 효소반응이 가능하다고 하는 사실을 제시하고 있다. 또한 효소의 반응용매계를 바꿈에 따라 효소의 기질특이성이 달라지기도 하기때문에 현재까지 예상하지 못했던 신물질의 합성도 가능하게 되었다. 한편 이러한 이점 외에도 유기용매계의 효소반응이 지용성 기질의 용해도를 높이고, 열역학적 반응평형을 가수분해에서 합성반응 쪽으로 이동시킬 수 있으며, 물에 의존적인 기타의 반응들을 억제할 뿐만 아니라, 경우에 따라서는 효소의 회수 및 재이용이 가능하며 열 안정성이 향상된다고 하는 점등 여러가지 측면에서의 이점이 알려져 있다(5,24)

유기용매를 포함하는 반응계로서는 二相系(10), 역미셀계(11), 微水系(2,27) 등이 있으며 이들 유기용매계에서의 효

소반응을 효율적으로 수행하기 위해서 1980년대 들어와서는 여러가지 방법(25)들이 고안되어 있다. 즉 효소를 polyethylene glycol과 공유결합시켜 유기용매내에서의 용해도를 높게 하여 반응속도를 촉진시키는 방법, 또는 적당한 계면활성제와 복합체를 형성시켜 유기용매에 가용화시키는 방법, 미분말상으로 분산 현탁시키거나 또는 적당한 담체 표면상에 물리적으로 흡착시키는 방법, 역미셀 혹은 소수성 gel로의 포매, 미생물균체를 직접 용매에 분산 현탁시키는 등의 여러 가지 방법을 채용하여 반응효율을 높이고 새로운 물질의 합성에도 성공하고 있다. 유기용매계에서의 반응으로는 lipase, esterase, protease 등이 잘 알려져 있으며 가수분해반응의 역반응 또는 ester 교환반응을 통하여 ester, amide 화합물들을 합성하고 있다(6,13,20). 이들 가수분해효소 중에서도 특히 lipase의 연구가 가장 왕성하게 수행되어 종래의 수계반응에서는 불가능했던 transesterification(20), esterification(6), aminolysis(12,13), thiotransesterification(27), oximolysis(27)등의 반응을 유기용매계에서 수행하고 있으며 여러 종류의 물질들을 용이하게 합성하고 있다. Bell 등(1)은 palmitic acid 또는 oleic acid를 함유하는 octanol의 반응계에서 lipase활성이 높은 *Rhizopus arrhizus* mycelia를 현탁시켜 70% 이상의 octyl ester를 얻고 있으며, 이와 유사한 방법으로 geranyl butyrate, menthyl acetate, terpene alcohol ester(15)와 같은 fragrance esters의 합성에도 성공하고 있다.

한편 lipase를 이용한 transesterification반응에서는 유기화합물의 위치선택적 변환반응이 중요하며 Klivanov 등(22)이 lipase에 의한 glycols의 위치선택적 acylation을, Holla 등(7)은 *Candida cylindracea* lipase로 vinyl ester와 glycol의 선택적 acylation반응을 수행하고 있다. 또한 많은 유기화합물 중에서도 glycerol 유도체, ferrocenylethanol, sugar 등과 같이 hydroxyl기를 갖고 있는 화합물이 관심의 대상이 되고

*To whom correspondence should be addressed

있으며, Wang(24), Therisod(21) 등이 glucose의 primary hydroxyl기를 lipase에 의해 위치선택적(regioselectivity)으로 acylation하고 있다.

본 연구는 수계 혹은 비수계 용매에서 효소의 특수기능을 이용하여 보다 고부가가치의 신물질의 합성에 초점을 맞추어 계획되었으며, 이미 그 연구의 일환으로 유기용매계에서 lipase를 이용하여 계면활성능이 우수한 당 ester 화합물을 합성하여 그 구조와 기능을 이미 전보에 밝힌 바 있다(18). 본보에서는 fructose 유도체를 합성하여 기능성소재로의 개발 가능성을 모색하기 위해서 pyridine 반응계에서 lipase의 acylation 반응에 대해 검토하고, 이때 효소의 최대활성을 나타내는 반응조건을 설정한 결과에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 및 장치

본 실험의 기질로 사용한 fructose와 vinyl butyrate는 Junsei(Japan)와 Fluka(Switzerland)제품을, *Pseudomonas* sp. lipase AK는 Amano사의 제품을 사용하였으며 하루동안 동결건조한 것을 사용하였다. 유기용매는 Aldrich(U.S.A.)의 무수 pyridine을, 분석용 당유도체를 위한 hexamethyldisilazane, trimethylchlorosilane은 Aldrich사 (USA) 제품을 사용하였다. Gas chromatography의 internal standard인 tetradecane은 Sigma(U.S.A.)제품을, 그 외 모든 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

반응산물의 정량에는 Gas chromatography(Hewlett Packard, HP 5890 II)를, 수분함량 측정에는 Mettler사의 METTLER DL 18 Karl Fisher Titrator를, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)를 사용하였다.

분석법

Transesterification 반응에서 생성된 산물을 확인하기 위해서는 thin layer chromatography(TLC) 분석을 행하였다. 전개용매는 chloroform : methanol : acetic acid : H₂O(15 : 12 : 1 : 3)을, 발색시약(4)으로서는 diphenylamine : aniline : phosphoric acid(5 : 5 : 1)를 사용하였다.

TLC분석에서 확인된 반응산물의 2차확인용은 gas chromatography(GC)에 의해 정량하였다. 즉 3일간 반응시킨 시료 0.1 ml를 취하여 hexamethyldisilazane 0.02 ml와 trimethylchlorosilane 0.01 ml를 첨가하여 trimethylsilylation(TMS) 유도체로 만든 후(19), 그 0.5 μ l를 gas chromatography에 주입하여 반응산물을 확인하였다. 이때의 GC분석조건은 column, 5% OV-101 packard column, injector와 detector의 온도, 300°C, carrier gas, 질소, flow rate, 30 ml/min 이며, detector는 flame ionization detector(FID)를 사용하였다. 정량 분석시의 internal standard로는 tetradecane을 사용하였다.

효소반응

Acyl fructose 화합물을 합성하기 위해 fructose를 수용체로 하고 fatty acid의 vinyl ester를 acyl기의 공여체로 하여 무수 pyridine용액 속에서 반응을 행하였다. 이때 pyridine 속의 잔존 수분을 제거하기 위해서는 molecular sieve를 1 g/ml 첨가하였으며 효소는 분말상태로 pyridine 속에 잘 분산

시켜 진탕하면서 반응을 행하였다. 반응산물은 반응중 적당한 시간간격으로 sampling 하여 TLC와 GC로 확인하였다.

효소의 선정

Fructose에 fatty acid를 효율적으로 transesterification하는 효소를 검색하기 위해 시판하는 lipase, protease등을 구입하여 반응을 행한 결과 전보에 보고한 바와 같이 *Pseudomonas* sp. 유래의 lipase AK(Amano 사)가 가장 우수하다는 것이 밝혀져(19), 본 실험에서는 crude한 lipase AK powder를 충분히 건조시킨 후 반응에 사용하였다.

반응조건 검토

당 에스테르 화합물의 효소합성을 위한 최적 반응조건을 설정하기 위해 기질비, 효소농도, 반응시간, 온도 및 수분함량 등의 영향을 검토하였다. 3일간 반응시킨 후, fructose의 전환율을 GC분석하여 서로 비교 검토하였다. 무수 pyridine의 반응계에서는 molecular sieve(3 Å)를 첨가하였으며(17) 수분함량의 영향을 검토하기 위해서는 molecular sieve(3 Å)를 첨가하지 않고 소량의 수분을 단계별로 첨가하여 반응에 미치는 수분의 영향을 검토하였다.

결과 및 고찰

반응산물의 확인

Lipase AK에 의한 transesterification의 반응양상을 확인하기 위해 우선 무수 pyridine 1 ml에 효소 10 mg를 sonicator에 의해 질 분산시킨 후 최종농도가 fructose 0.1 M, vinyl butyrate 0.6 M, molecular sieve 3 Å 1 g/ml가 되도록 첨가하여 45°C, 150 rpm에서 반응시켰다. 이때 반응시료 중의 반응산물을 확인하기 위해 fructose를 standard로 하여 TLC분석을 행하였다. 그 결과(Fig. 1A) 반응시료에서 2개의 spot가 생성되어 반응시간의 연장과 더불어 반응생성물의 양이 차츰 증가하는 것을 알 수 있다. 그것도 반응초기에는 Rf 치가 낮은 product 1만이 생성되다가 반응시간의 연장과 함께 product 2의 생성량이 증가함을 알 수 있다. TLC분석 결과를 토대로 하여 반응전 시료를 blank로 하고 3일 반응시킨 시료를 sample로 하여 GC분석을 행하였다. Fig. 1C에 나타난 결과와 같이 fructose peak이후에 두 물질의 peak가 검출되었다. 이렇게 생성된 두 물질에 대해서는 전보(18)에서 이미 그 구조에 대해 검토하여 product 1이 monobutryl fructose, product 2가 dibutryl fructose임을 밝힌 바 있다. 이때 fructose에 결합한 butyl기의 위치에 대해서는 아직 확인할 수는 없으나 반응산물이 환원력을 가지고 있는 것으로 보아 fructose 2번 탄소에는 결합하지 않은 것으로 판단되었다. 한편 전보(18, 19)에서 보고한 바와 같이 동일 효소에 의해 합성되고 계면활성능이 우수한 lauryl fructose의 경우에는 lauryl group이 fructose의 1번 위치에 결합하고 있다는 것이 확인되었다.

당 ester합성을 위한 기질의 혼합비

효소의 transesterification반응에 있어 기질인 fructose와 vinyl butyrate의 혼합비가 당 ester 합성에 주요한 영향을 미치는

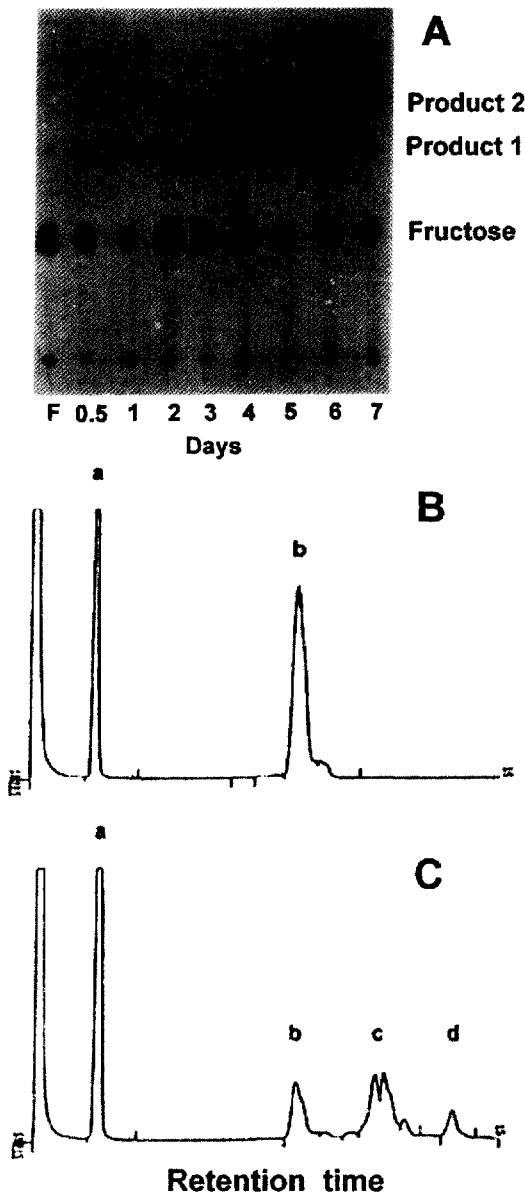


Fig. 1. TLC profile (A) and gas chromatograms (B and C) of trimethylsilylation derivatives of reaction mixture by lipase AK. B, before enzyme reaction; C, after enzyme reaction. Peaks; a, internal standard(tetradecane); b, fructose; c, product 1; d, product 2.

인자 중의 하나일 것으로 판단되어 fructose와 효소의 양을 고정하고 vinyl butyrate의 양을 변화시켜 반응을 행하였다. 즉 0.1 M의 fructose와 1 g의 molecular sieve 3 Å를 함유하는 1 ml의 무수 pyridine용액에 lipase(10 mg)을 첨가하고 fructose : vinyl butyrate(M:M)비가 Table 1과 같이 되도록 조정하여 45°C에서 3일 동안 반응시켜 GC에 의해 반응생성물의 양을 정량하였다.

그 결과 fructose와 vinyl butyrate의 혼합비가 1:10일 때를 정점으로 하여 생성물의 합성량이 증감하였고 이때의 변환율은 84.3%에 달하였다. 기질비가 1:2 이상에서는 50% 이상의 변환율을 보였으며, 기질비가 증가할수록 dibutryl fructose ester의 생성량이 증가함을 알 수 있었다. 즉 acyl

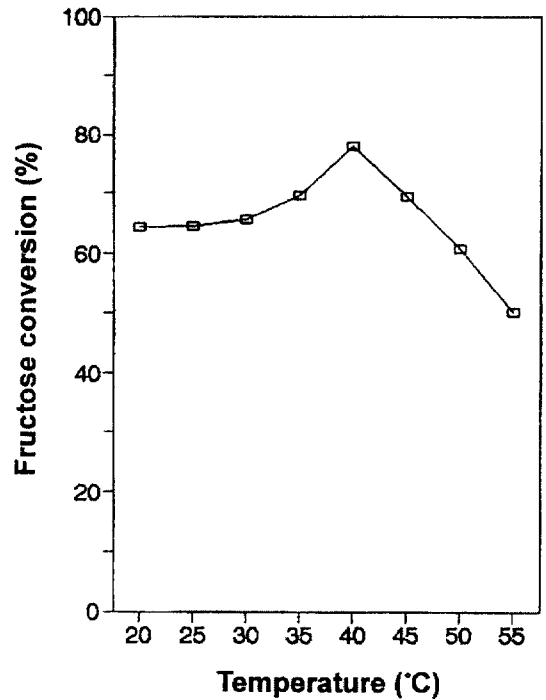


Fig. 2. Effect of temperature on fructose ester synthesis (reaction time: 3 days).

group의 공여체의 비율이 높아짐에 따라 acylation의 기회가 증대됨을 알 수 있으나 butyl기를 두개 이상 가진 화합물은 생성되지 않았다.

Mutua 등(14)의 *Candida* sp. lipase을 이용한 methyl glycoside fatty acid ester의 합성에서 methyl glycoside와 methyl oleate의 비가 1:4일 때 가장 반응속도가 빠르다고 하는 연구결과와는 직접 비교할 수는 없으나 일반적으로 acyl group 공여체의 농도가 높을수록 어느정도까지는 반응속도가 증가하는 것으로 알려져 있다.

효소농도의 영향

기질농도를 일정하게 하고 효소를 달리했을 때의 영향을 검토하기 위해 무수 pyridine 1 ml에 최종농도가 fructose 0.1 M, vinyl butyrate 0.6 M 및 molecular sieve(3 Å, 1 g/ml) 1 g/ml가 되도록 첨가하고 lipase의 농도를 2 mg에서 14 mg까

Table 1. Effect of the ratio of fructose and vinyl butyrate on sugar ester synthesis

Molar ratio of fructose: vinyl butyrate	Fructose conversion (% after 3 days)	Ratio of products (%)	
		A	B
1: 1	47.7	92.7	7.3
1: 2	52.7	90.9	9.1
1: 4	54.4	90.2	9.8
1: 6	62.6	81.8	18.2
1: 8	75.0	80.1	19.9
1: 10	84.3	71.1	29.0
1: 12	78.6	78.4	21.6

A, Monobutryl fructose ester; B, Dibutryl fructose ester.

Table 2. Effect of the concentration of lipase AK on sugar ester

Concentration of lipase (mg)	Fructose conversion (% after 3 days)	Ratio of products (%)	
		A	B
2	13.3	95.1	4.9
4	31.2	93.8	6.2
6	48.5	91.5	8.5
8	58.2	88.2	11.8
10	63.7	85.9	14.1
12	67.5	82.7	17.3
14	69.9	80.6	19.4

A, Monobutyl fructose ester; B, Dibutyl fructose ester.

지 변화시켜 45°C에서 3일동안 반응시킨 후, GC로 그 변환율을 측정하였다. Table 2는 첨가된 효소의 농도에 따른 변환율을 나타낸 결과이다. 첨가된 효소량이 8 mg이 될 때까지는 반응속도가 급속하게 증가하였으나, 첨가된 효소농도가 12 mg 이상일 때는 증가폭이 둔화되었다. 효소량의 증가에 따라 fructose의 변환율이 증가하는 반응양상을 보이고 있으며, 동시에 반응산물중 dibutyl fructose의 생성비율도 증가함을 보여주고 있다. 이 결과는 전술한 기질비를 증가시킬때의 결과와도 유사하며 후술하는 반응시간과도 상관관계를 나타내는 것으로 보아 반응기회의 증대에 의한 결과라고 판단된다. 즉 본 반응계의 최종산물은 dibutyl fructose로서 반응초기 mono type ester가 합성된 후 diester 화합물이 합성되는 것으로 보여진다. 그러나 전보(19)에서 보고한 결과와는 lauric acid와 같이 비교적 긴 chain의 지방산을 esterfication시킬 때는 diacyl compound가 전혀 생기지 않고 mono type만 생성되어 효소의 acylation 반응과 chain의 길이간에는 밀접한 관계가 있음을 보여준다.

온도의 영향

Butyl fructose ester의 효소합성시 반응온도에 의한 영향을 조사하기 위해 무수 pyridine의 반응액(fructose 0.1 M, vinyl butyrate 1.0 M, lipase 10 mg/ml, molecular sieve 3 Å 1 g/ml)을 20°C에서 55°C까지의 범위에서 3일간 반응시켜 그 변환율을 경시적으로 측정하였다.

Fig. 2에 나타난 결과와 같이 반응온도가 증가함에 따라 반응속도가 빨라지나 온도가 50°C 이상에서는 급속히 낮아짐을 볼 수 있다.

수분함량의 영향

유기용매 중 효소반응의 특성은 반응계에 포함된 수분의 함량에 의해 강하게 영향을 받기 때문에(25) 반응계에 첨가하는 수분의 양에 따른 효소활성을 검토하고 최적활성을 나타내는 수분의 첨가량을 결정하기 위해 수분의 첨가량에 따른 효소활성을 조사하였다. 즉, 과량의 molecular sieve (3Å)로 수분을 제거한 무수 pyridine에 3차 증류수를 0%에서 5%(v/v)가 되도록 첨가하고 fructose와 vinyl butylate를 1:10의 비율로 용해시킨 후, 효소를 첨가하여 40°C에서 3일 동안 반응시켜 변환율을 측정하여 서로 비교하였다. 반응액을 TMS로 처리한 후 GC분석하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 반응계의 수분함량이 증가할수록 반응전환율은 감소

Table 3. Effect of water content on enzymatic activities in anhydrous pyridine

Water content (V/V %)	Conversion rate (% After 3 day)	Product	
		Monobutyl fructose ester	Dibutyl fructose ester
0.0	79.01	89.4	10.6
0.5	78.03	90.4	9.6
1.0	63.97	100.0	-
1.5			

하는 경향을 보였으며, 또한 반응산물의 비도 달라져 수분농도 1%에서는 monobutyl fructose만이 생성되었다. 수분함량이 1%이상인 경우에는 반응 sample의 silylation화가 곤란하기 때문에 GC분석을 더 이상 행할 수 없었다. 따라서 lipase에 의한 butyl fructose의 합성시에는 수분을 첨가하지 않은 무수 pyridine 반응계에서 반응을 행하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

이상 *Pseudomonas* sp. lipase AK를 사용하여 fructose esters를 합성하는 반응조건을 Table 4에 나타내었다.

반응전환율

이상의 실험에서 설정한 반응조건에서 반응 product의 생성경향과 최대전환율을 검토하기 위해 반응 14일동안 fructose의 전환율, monobutyl fructose, dibutyl fructose의 생성량을 조사하였다. 반응은 무수 pyridine계 (fructose 0.1 M, vinyl butyrate 1.0 M, molecular sieve 3 Å 1 g/ml, lipase 10 mg/ml)에서 45°C, 150 rpm에서 경시적으로 행하였으며 GC로 product를 정량하였다. 그 결과는 Table 5과 같으며 반응 14일에는 92%이상의 전환율을 나타내었다. 또한 반응초기에는 주로 monobutyl fructose가 생성되다가 반응시간의 경과에 따라 dibutyl fructose의 비가 증가함을 알 수 있었

Table 4. Conditions of optimal reaction

Ratio of fructose : vinyl butyrate	1 : 10
Concentration of enzyme	10 mg/ml
Reaction time	3 days
Velocity of agitation	150 rpm
Temperature	40°C
Water content	no addition

Table 5. Effect of reaction time on sugar ester synthesis

Reaction time (day)	Fructose conversion (%)	Ratio of products (%)	
		A	B
0.5	29.5	87.1	12.9
1	33.4	83.2	16.8
2	45.7	80.0	20.0
3	63.4	76.3	23.7
4	70.7	73.6	27.4
5	75.1	69.3	30.7
6	80.3	65.5	34.5
7	86.6	65.0	35.0
14	92.0	63.1	36.9

A, Monobutyl fructose ester; B, Dibutyl fructose ester

다. 그러나 반응시간을 더욱 길게 해주면 이와 같은 비는 다소 증가하지만 증가속도는 극히 낮아져 제2의 esterification반응은 서서히 진행되고 있음을 알수 있었다. 이와같이 증가속도가 낮아지는 것은 butyl기의 공여체인 vinyl butyrate의 양이 효소반응의 진행에 따라 감소하기 때문인지 아니면 효소의 실활등의 다른 이유에 의한 것인지에 대해서는 아직 확실한 결론을 얻을 수가 없었다. 전보(19)에서 보고한 바와 같이 지방산의 길이가 길어지면 diacyl fructose의 생성이 억제되고 반응속도는 지방산 chain의 길이에 비례해서 증가한다고 하는 결과로 보아, 본 실험에 사용한 lipase AK는 fructose의 1번위치의 OH에 우선적으로 acyl기를 esterification하고 일정길이 이상의 acyl기의 경우에는 그 입체적인 장애때문에 제2의 esterification반응이 일어나지 않는 것으로 판단되었다.

이후 본 효소의 fructose에 대한 transesterification반응에 있어 그 위치선택성을 반응 kinetics적인 측면에서 규명하고 반응산물의 물성등에 대해 검토하고자 한다.

감사의 말

이 연구는 1996년도 교육부 기초과학육성연구비 지원에 의한 연구(BSRI-96-4410)로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Bell, G., J.A. Blain, J.D.E. Paterson, C.E.L. Shaw, and R.J. Todd. 1978. *FEMS Microbiol. Lett.* **3**, 223-225.
- Boeriu, C.G., J.S. Dordick, and A.M. Klivanov. 1986. Enzymatic reaction in liquid and solid paraffins. *Biotechnol.* **4**, 997-998.
- Boland, W., C. Frobl, and M. Lorenz. 1991. Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis* 1049-1072.
- Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1986. Carbohydrate analysis: a practical approach, IRL PRESS, p12.
- Dordick, J.S. 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvent., *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 194-211.
- Gillies, B., H. Yamazaki, and D.W. Armstrong. 1987. Production of flavor esters by immobilized lipase. *Biotethnol. Lett.* **9**, 709-714.
- Holla, E.W. 1989. Enzymatic synthesis of selectively protected glycals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**, 220-221.
- Jones, J.B. 1986. Enzymatic in organic synthesis. *Tetrahedron* **42**, 3351-3403.
- Klibanov, A.M. 1986. Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech.* **16**, 354-359.
- Kwon, D.Y., K.H. Kim, and J.S. Rhee. 1987. Characterization of lipase in two phase system. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 43-48.
- Luisi, P.L. and C. Laane. 1986. Solubilization of enzymes in apolar solvents via reverse micellers. *Trends Biotechnol.* **4**, 153-161.
- Margolin, A.L. and A.M. Klibanov. 1987. Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3802-3804.
- Matos, J.R., J.B. West, and C.H. Wong. 1987. Lipase catalyzed synthesis of peptides: preparation of a penicillin G precursor and other peptides. *Biotechnol. Lett.* **9**, 233-236.
- Mutua L.N. and C.C. Akoh. 1993. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida* sp. lipase. *JAOCS* **70**, 43-46.
- Nishio, T., K. Takahashi, T. Yoshimoto, Y. Koderu, Y. Saito, and Y. Inada. 1987. Terpene alcohol ester synthesis by polyethylene glycol-modified lipase in Benzene, *Biotechnol. Lett.* **9**, 187-190.
- Riva, S., J. Chopineau, A.P.G. Kieboom, and A.M. Klibanov. 1988. Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 584-589.
- Sharma, A. and S. Chattopadhyay. 1993. Lipase catalysed acetylation of carbonhydrates. *Biotech. Lett.* **15**, 1145-1146.
- Sin, Y.M., S.H. Chung, J.Y. Park, and T.H. Lee. 1996. Synthesis of biodegradable emulsifier using lipase in anhydrous pyridine. *Biotech. Lett.* **18**, 689-694.
- Sin, Y.M. and T.H. Lee. 1997. Enzymatic synthesis of fructose ester by lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnol. Lett.* submitted.
- Sweely, C.C., R. Bentley, M. Makita, and W.W. Wells. 1963. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497-2507.
- Tanaka, T., E. Ono, M. Ishihara, S. Yamanaka, and K. Takinami. 1981. Enzymatic acyl exchange of triglycerides in n-hexane. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2387-2389.
- Therisod, M. and A.M. Klibanov. 1986. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5638-5640.
- Therisod, M. and A.M. Klibanov. 1987. Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3977-3981.
- Wang, Y.F., J.J. Lalonde, M. Momogan, D.E. Bergbreiter, and C.H. Wong. 1988. Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7200-7205.
- Yamane, T. 1991. Factors affecting activity of enzyme in organic solvent. *Nippon Noeikagaku Kaishi.* **65**(7), 1103-1106.
- Zaks, A. and A.M. Klibanov. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science.* **224**, 1249-1251.
- Zaks, A. and A.M. Klibanov. 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 3192-3196.

(Received July 4, 1997/Accepted September 1, 1997)

ABSTRACT: Synthesis of Fructose Ester Compound by Lipase in Organic Solvent

Yeong-Min Sin, Sang-Ok Lee, Jae-Dong Lee and Tae-Ho Lee* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Sugar ester compounds were synthesized in organic solvent using lipase. Anhydrous pyridine was selected as a solvent because of reasonable solubility of sugar. The synthesis of sugar ester compound was catalyzed by *Pseudomonas* sp. lipase in the reaction system containing anhydrous pyridine as a solvent and vinyl butylate as an acyl donor. The analysis of the reaction product by TLC and GC showed that monobutryl and dibutryl fructose esters were synthesized by transesterification reaction between fructose and vinyl butyrate. Optimal conditions for the transesterification reaction were as follows: the ratio of fructose/vinyl butylate, 1:10(M:M); reaction temperature, 40°C; velocity of shaking, 150 rpm; concentration of enzyme, 10 mg/ml. The longer the reaction period, the higher the conversion rate, and the conversion rate reached up to 90% after about 10 days of reaction. Monobutryl fructose was mainly synthesized in the early stage of reaction, but the amount of dibutryl fructose increased gradually as the reaction progressed. When a small amount of water was added to the reaction mixture (micro-water system), the reaction rate decreased, while that of monobutryl fructose increased. Only monobutryl fructose was obtained when 1% water was added to the reaction mixture.