

## 메틸프룩토시드를 이용한 과당계열 당 지방산 에스테르의 효소적 합성

허 주 형 · †김 해 성

명지대학교 화학공학과

(접수 · 1998. 9. 23., 게재승인 : 1998. 12. 5.)

### Enzymatic Synthesis of Fructose-based Sugar Fatty Acid Ester Using Methyl Fructoside

Joo-Hyung Heo and Hae-Sung Kim†

Department of Chemical Engineering, Myong Ji University, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea

(Received · 1998. 9. 23., Accepted · 1998. 12. 5.)

Enzymatic synthesis of fructose-based sugar fatty acid esters, such as methyl fructoside oleic acid mono and diester, was investigated using methyl fructoside as a sugar starting material. For the production of methyl fructoside fatty acid monoester by solvent process, 2-methyl-2-propanol was found to be a good reaction medium resulting a higher yield and productivity due to its high sugar solubility. The yield and productivity of methyl fructoside oleic acid monoester were 70% and 12.6g/L-hr, respectively, when molar ratio of methyl fructoside, initial concentration of methyl fructoside, enzyme(Novozym 435) content, and reaction temperature were 3:1, 200g/L, 1%(w/v), and 60°C, respectively. Methyl fructoside oleic acid diester was prepared by lipase-catalyzed diacylation of methyl fructoside and oleic acid in the solvent-free process. Maximum yield of 98% and productivity of 140g/L-hr were achieved when molar ratio(methyl fructoside and oleic acid) of 1:2, enzyme content of 10%(w/w) and reaction temperature of 70°C were applied for the operating conditions under a reduced pressure of 20~200 mmHg.

Key Words : Sugar fatty acid ester, methyl fructoside, lipase-catalysed acylation, food emulsifiers.

### 서 론

당 분자의 수산기가 지방산의 카르복실기와 아실화하여 에스테르 결합을 이룬 당 지방산 에스테르(sugar fatty acid ester)는 당과 지방산의 종류 및 치환도를 조절하여 전 범위에 걸친 친수-친유 평형(HLB)값을 나타내는 비이온성의 양쪽성 화합물로서 인체에 무해하며, 혐기나 호기조건에서 쉽게 생분해되고, 치환도에 따라 소화흡수 조절이 가능하여 식품 및 의약품 등을 비롯한 다양한 용도의 계면활성제와 첨가제로 이용되며, 식이지방의 소화 흡수를 조절하는 가용성 지방과 대체지방(fat substitutes) 등으로 이용할 수 있으므로 이를 이용한 새로운 생리 활성과 기능성을 부여하기 위한 연구와 응용 및 용도개발이 계속해서 증가해 가고 있다(1-3).

당 지방산 에스테르의 합성공정은 크게 화학적 합성공정과 효소적 합성공정으로 구분되는데, 생체 및 환경 친화성, 식품 적합성 및 안전성과 분리 정제 그리고 반응선택성의 관점에서 효소적 합성공정이 유망한 생산기술로 평가되고 있으며, 상업적으로

쉽게 이용할 수 있는 리파아제가 주로 이용되고 있다(4).

당 에스테르 합성반응계는 크게 수용상 반응계, 유기상 반응계, 무용매상 반응계 및 초임계상 반응계로 구분할 수 있는데, 대부분 유기상 반응계에서 반응을 수행하고 있고, 무용매상 반응계와 초임계상 반응계는 차세대의 새로운 효소반응계로서 가능성을 검토하고 있다(5, 6).

일반적으로 수용상 반응매질에서는 지방산과 같은 유기기질의 용해도가 낮고, 물의 활동도가 높아 반응평형이 가수분해 반응에 제한되어 있으므로 수율이 낮으며, 근본적으로는 물의 유전상수가 매우 높아 리파아제의 활성화가 쉽게 이루어지지 않는 것으로 평가되고 있다(7). 이를 해결하기 위하여 당의 초기농도를 높게 유지하는 방법, 상용용매(mutual solvent or cosolvent)를 사용하여 유전상수나 물의 활동도를 상대적으로 감소시키는 방법, 분자트랩이나 2상(biphasic)반응계를 구성하여 반응평형을 합성반응쪽으로 이동시키는 방법, 기질 선택성이 우수한 전이효소(transferase)를 이용하여 반응수율을 증가시키는 방법 등을 들 수 있는데, 근본적으로 그 한계가 있으며, 경제성 및 산업화의 관점에서 바람직하지 못한 것으로 평가되고 있다(8).

이에 반하여 유기상 반응매질은 유전상수가 수용상에 비하여 낮아 쉽게 리파아제의 활성화를 촉진시킬 수 있으며, 유기기질의 용해도가 높고, 수분함량을 제한하여 가수분해 반응을 억제

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Myong Ji University, Yongin, Kyonggi 449-728, Korea  
Tel : 0335-30-6387, Fax : 0335-37-1920  
e-mail: seastar@wh.myongji.ac.kr

할 수 있으므로 반응평형이 합성반응에 우세하며, 생성물 및 효소의 분리가 용이하여 수율을 높일 수 있어서 당 지방산 에스테르 합성반응에 유리한 것으로 평가되고 있다(9). 그러나, 유기용매에 의하여 효소의 기질 특이성이 변형되거나 활성이 비가역적으로 실활될 수 있고, 당의 용해도가 낮아서 유기상 반응계의 장점을 효과적으로 이용하기 위해서는 적절한 반응매질의 선정과 당의 용해도 향상기술이 중요하다.

무용매상 반응매질은 열안정성이 뛰어난 효소촉매의 개발과 함께 최근 조심스럽게 연구되고 있는 분야로 유전자 변이에 의한 변종의 효소를 개발하여 이용하고 있는데, 일반적으로 당의 용용온도가 높아 아직까지는 실험실적 연구수준에 머물러 있으며, 보다 우수한 효소의 개발뿐만 아니라, 당의 용용온도 조절 역시 함께 연구되어야 할 것으로 내다본다(10).

당 지방산 에스테르의 생산성을 향상시키기 위해서는 반응계가 효소반응에 합당하여야 할 뿐만 아니라, 친수성이 강한 당과 소수성이 강한 지방산을 충분히 혼합시킬 수 있어야 하는데, 대부분의 경우에 있어서 당의 용해도와 용용도가 근본적인 문제점으로 평가되고 있다.

높은 용해도를 갖는 당이 선정되어야만 용매공정에서의 근본적인 문제점인 당의 용해도를 향상시켜서 수율과 생산성의 향상은 물론, 상용용매의 선정이 촉매의 활성, 생체 적합성, 식품 안전성 및 생성물의 분리정제의 관점에서 바람직하게 이루어질 수 있으며, 낮은 용용온도를 갖는 당이 이용될 수 있어야만 무용매 공정에서의 근본적인 문제점인 당의 용용온도를 낮출 수 있으므로 식품용도로 사용할 수 없는 금속비누 등의 유화제 없이 지방산 및 촉매와 효과적으로 혼합할 수 있고, 비교적 낮은 온도에서 조업이 가능하므로 당의 변성과 효소의 불활성화를 막아 수율과 생산성 향상 및 분리정제가 용이할 것으로 판단된다.

효소를 이용한 당 지방산 에스테르 합성반응은 당분자의 구조가 간결하면서 아실화할 수 있는 수산기들이 상호 차폐되거나 간섭되지 않는 구조를 갖어야 하며, 아실화 반응성이 우수한 것이 유리한 것으로 평가되는데, 자당과 같은 이당류보다는 단당류와 그 유도체들이 선호되고 있다.

이에 따라 일부에서는 알킬글리코시드류(11), 유기분산 복합체(12) 및 당 아세탈(13) 등을 사용하여 용해도 및 용용도를 향상시키고자 하였는데, 아직까지는 실험실 수준에 머물러 있으며, 대부분의 당의 입체구조가 피란형 구조(pyranose)이고, 아실화 반응성이 높은 일급알코올기의 수산기를 대부분 하나만 가지고 있어서 치환도를 비롯한 반응성 및 용해도와 용용도가 대체적으로 만족할 만한 수준에 미치지 못하는 것으로 평가되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 단당류중에서 분자구조가 간결한 퓨란형 구조(furanose)이면서 반응성이 높은 일급알코올기의 수산기를 2개나 함유하고 있는 과당계열의 메틸프루토시드(methyl- $\beta$ -D-fructofuranoside)를 반응출발물질로 사용하고자 한다.

메틸프루토시드는 과당의 아노미 탄소인 2번 탄소의 수산기에 메톡시기(methoxy group)가 치환된 비환원성(non-reducing), 과당계열의 매당체(glycoside)(14)로서 당 에스테르 합성에 적합한 물리화학적 물성을 지닌 것으로 판단된다.

그러므로, 본 연구에서는 용해성, 용용성, 반응성과 안정성이 우수하여 당 지방산 에스테르 합성에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단되는 메틸프루토시드를 반응출발물질로 이용하여 당 지방산 에스테르 합성공정의 문제점을 원천적으로 해결하고

경쟁력있는 고유기술화가 가능한 새로운 생산공정을 개발하는데 목적이 있으며, 나아가 지금까지 보고되어 있지 않은 과당계열의 새로운 기능성 당 지방산 에스테르의 생산기술개발과 현재까지 이용이 제한되어 있는 과당의 새로운 활용방안을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 용매법에 의한 메틸프루토시드 올레산 모노에스테르의 효소적 합성

#### • 최적 반응매질

2-메틸-2-프로판올(2-methyl-2-propanol, Showa Chemicals)과 2-메틸-2-부탄올(2-methyl-2-butanol, Sigma)을 반응매질로 하여 각각 30mL에 1.2g의 메틸프루토시드(6.18 mmol)와 0.66mL(2.06mmol)의 올레산(Aldrich)을 용해시키고, 반응온도 60°C로 유지된 회분식 반응기에서 0.3g의 Novozym 435(immobilized lipase from *Candida antarctica* onto macroporous acrylic resin, EC 3.1.1.3, 활성도 7000PLU(propyl laurate units)/g, 수분함량 1~2%(w/w), 입경 0.3~0.9mm, 벨크필도 430kg/m<sup>3</sup>, Novo Nordisk) 효소촉매를 첨가하여 메틸프루토시드와 올레산의 아실화반응을 수행하였다. 메시간마다 시료를 채취하여 적당히 희석한 후, HPLC를 이용하여 Table 1에 나타낸 각각의 분석조건으로 각성분의 농도를 분석하였다.

메틸프루토시드는 허(15)의 방법에 의하여 대량생산 및 분리·정제하고 HPLC로 순수한 단일성분을 확인한 후 사용하였다.

메틸프루토시드 올레산 모노에스테르를 합성할 때에 아실 용여체인 유리 지방산과 지방산 메틸 에스테르의 영향을 검토하기 위하여, 위와 같은 반응조건에서 올레산 메틸 에스테르(TCI) 0.69mL(2.06mmol)와 올레산에 대하여 아실화반응을 수행하였고 동일한 방법으로 분석하여 비교하였다.

#### • 최적 효소

리파아제 효소의 생산균주는 *Candida cylindracea*(Fluka), *Candida rugosa*(Lipase MY, Amano), *Aspergillus niger*(Lipase AP, Amano), *Pseudomonas* sp.(Lipase CES, Amano), *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* 및 *Mucor miehei* 등을 선정하여 비교하였으며, 예비실험으로부터 당 지방산 에스테르 합성활성도를 갖는 *Candida rugosa*, *C. antarctica* 및 *M. miehei*에 대하여 자연효소와 고정화 효소를 비교하였다.

*C. antarctica*와 *M. miehei* 기원의 리파아제는 Novozym 435와 Lipozyme IM20(immobilized lipase from *Mucor miehei* onto macroporous acrylic resin, EC 3.1.1.1, 활성도 24BIU (batch interesterification units)/g, 수분함량 1~2%(w/w), 입경 0.25~0.65mm, Novo Nordisk)의 고정화 효소를 사용하였고, *Candida rugosa* 기원의 리파아제는 허(17)의 방법을 이용하여 다공성 실리카에 유기상 실란화법으로 효소를 고정화하여 사용하였다. 그리고, 칼-피셔 수분함량 측정기(Karl Fisher moisture titrator, MKS-210, KEM)를 이용하여 고정화 효소의 수분함량을 측정하였고, 수분함량이 1~2%(w/w)가 되도록 조절하여 사용하였다.

위와 동일한 실험조건에서 각각의 효소촉매에 대하여 아실화

Table 1. Analytical conditions of the following chemicals with HPLC.

Chemicals	Column	Detector /attenuation	Mobile phases (%:%,v/v)	Flow rate (mL/min)	Sample injection quantity( $\mu$ L)	Pump	Integrator /attenuation
Methyl fructoside	High performance carbohydrate column (4.6 $\times$ 250mm, Waters)	Refractive index $\times$ 16(Waters)	Acetonitrile : H <sub>2</sub> O = 75:25	1.4	20	M510 (Waters)	M746/x256 (Waters)
Fatty acid/FAME	Novopack-ODS (4.6 $\times$ 250mm, Beckman)	"	Methanol : acetic acid = 99.7:0.3	1	20	"	"
Methyl fructoside fatty acid esters	GPC (TSK-Gel 1000H $\times$ L +TSK-Gel 2000H $\times$ L -TSK-Gel 2500H $\times$ L, 7.8 $\times$ 300mm, Tosho)	"	THF =100	"	20~100	"	M746/x512 (Waters)

반응을 수행한 다음, 에스테르 합성능을 비교하여 최적 효소 기원을 선정하였다.

• 최적 효소 함량

위와 동일한 실험조건에서 Novozym 435의 함량을 반응체적에 대하여 0.1~3%(w/v)로 변화시키면서 아실화반응을 수행하고, 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르의 수율, 올레산의 전화를 및 반응양식의 관점에서 종합적으로 검토하여 최적 효소 함량을 결정하였다

• 최적 물비

위와 동일한 실험조건에서 메틸프룩토시드의 초기농도 40g/L를 기준으로 물비 1:2~10:1의 범위로 올레산 농도를 변화시키면서 아실화반응을 수행하고, 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르와 올레산의 수율 및 전화율에 대한 물비의 영향을 검토하여 최적 물비를 결정하였다.

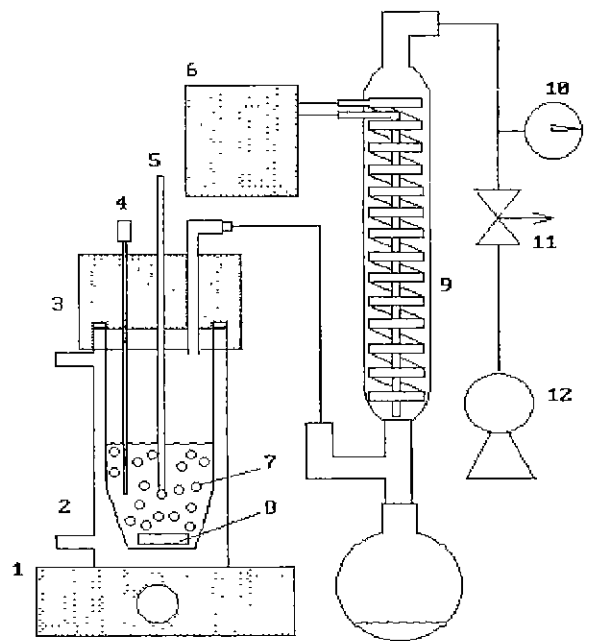
• 메틸프룩토시드의 초기농도

위와 같은 실험조건에서 물비를 3:1로 유지하고, 메틸프룩토시드의 초기농도를 40~200g/L로 변화시키면서 아실화반응을 수행하였다. 이로부터 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르의 수율과 올레산의 전화를 및 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르의 생성농도의 관점에서 종합적으로 검토하여 메틸프룩토시드의 초기농도에 대한 영향을 검토하였다

무용매법에 의한 메틸프룩토시드 올레산 디에스테르의 효소적 합성

• 아실 공여체의 영향

온도와 진공조절설비가 구비된 Figure 1의 반응기에 0.4g의 메틸프룩토시드와 팔미트산, 스테아르산 및 올레산 메틸 에스테르(TCI) 그리고 올레산을 1:2의 물비로 각각 가하고, Novozym 435를 반응물의 질량에 대하여 10%(w/w)가 되도록 첨가하였다. 반응온도 70 $^{\circ}$ C에서 메틸프룩토시드와 지방산 및 효소촉매가 균질의 반응 혼합물이 되도록 교반하면서 20~200mmHg의 진공도를 조절하여 디아실화반응을 수행하였다 매시간마다 클로로포름(Junsei)으로 미반응 지방산과 생성물인 메틸프룩토시드 지방산 디에스테르를 추출하고 적당한 비율로 THF(tetrahydrofuran, Tedia)용매에 녹여 HPLC와 GPC를 이용하여 분석



1. Magnetic stirrer 2. Water jacket 3. Vacuum-tight head  
 4. Sampling needle 5. Thermometer 6. Cooling bath  
 7. Immobilized enzyme(Novozym 435) 8. Magnetic bar  
 9. Dimnorth condenser 10. Vacuum gauge 11. Needle valve  
 12. Vacuum pump

Figure 1. Experimental reactor set-up for solvent-free, lipase-catalyzed diacylation of methyl fructoside with oleic acid.

하였다. 클로로포름으로 추출 후 반응기에 잔존하는 미 반응한 메틸프룩토시드는 물에 녹여 적당한 비율로 희석하거나 농축하여 HPLC로 분석하였다 반응후 분석된 각 성분의 농도로부터 각각의 아실 공여체에 대한 지방산 및 메틸프룩토시드의 전화율과 메틸프룩토시드 지방산 디에스테르의 수율을 검토하였다.

• 최적 효소

0.4g의 메틸프룩토시드와 1.31mL의 올레산을 혼화하고, Novozym 435와 Lipozyme IM 20을 각각 10%(w/w)씩 첨가하여 반응온도 70 $^{\circ}$ C, 20~200mmHg의 진공도 범위에서 메틸프록

토시드와 올레산의 디아실화반응을 수행하였다. 반응후 분석한 각 성분의 농도로부터 각각의 고정화 효소에 대한 지방산 및 메틸프록토시드의 전화율과 메틸프록토시드 지방산 디에스테르의 수율을 검토하여 최적 효소를 선정하였다.

#### • 최적 효소 함량

위와 동일한 반응조건에서 Novozym 435의 함량 5%(w/w)와 10%(w/w)에 대하여 디아실화반응을 수행하고, 각각의 고정화 효소에 대한 지방산 및 메틸프록토시드의 전화율과 메틸프록토시드 지방산 디에스테르의 수율을 검토하여 최적 효소함량을 결정하였다

#### • 최적 물비

위와 같은 반응 조건에서 0.4g의 메틸프록토시드에 대한 올레산의 이론적인 물비를 근거로하여 물비 1:2와 1:3에 대한 디아실화반응을 수행하고, 지방산 및 메틸프록토시드의 전화율과 메틸프록토시드 지방산 디에스테르의 수율을 검토하여 최적물비를 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 최적 반응매질

당 지방산 에스테르의 효소적 합성공정은 상용용매를 사용하는 용매공정과 상용용매를 사용하지 않고 당과 지방산을 용융상태에서 혼합시키는 무용매공정으로 구분할 수 있다. 효소적 합성은 주로 저치환도의 당 지방산 에스테르 합성에 유리한 것으로 보고되어 있는데, 용매공정은 비교적 낮은 온도에서 반응이 용이한 모노아실화에 유리하고, 무용매공정은 당의 용융상태를 유지해야 하며 모노아실화에 비하여 비교적 높은 반응온도를 필요로 하는 디아실화에 유리한 것으로 평가된다. 그러나, 당의 종류와 물성에 따라서 반응정도가 결정되므로 효소를 이용한 용매공정과 무용매공정의 근본적인 연구의 주안점은 물리화학적 특성이 우수한 당의 효과적인 이용에 있다.

메틸프록토시드는 Table 2에 나타난 바와 같이 다른 당류들보다 용해도와 용융성이 높고 반응성이 좋아서 일반적인 당류로는 합성하기 어려운 디에스테르를 쉽게 생성할 수 있는 것으로 예비실험을 통하여 알 수 있었다. 따라서, 순수한 모노에스테르를 합성하기 위해서는 분자간의 인력과 상용용매와의 상호작용을 통하여 효소와 기질의 반응성을 조절함으로써 모노에스테르만을 선택적으로 합성할 수 있는 용매공정이 유리한 것으로 판단되었고, 디에스테르는 무용매공정에서 합성하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다

용매공정에서의 중요한 연구 주안점은 반응성과 독성이 없고 인체에 무해하며 효소 활성에 영향이 적고 용매의 친수-소수도가 적절히 조절되어 리파아제의 활성화가 용이하면서 당의 용해도가 높은 용매를 선택하는 것이 중요하다. 그러나, 실제적으로는 위에서 언급한 용매의 선택조건들이 대부분 서로 상반되므로, 지금까지 보고된 연구결과들의 공통된 어려움으로 지적되고 있다.

이와 같은 관점에서 볼때, 본 연구에서 사용한 메틸프록토시드는 기존의 당류보다 용해성이 매우 뛰어나므로 용매공정에 의한 당 에스테르 반응계를 구성할때 효소의 활성과 식품 안전성의 관점에서 유리하게 선택할 수 있는 장점을 갖고 있다. 따라서, 모노에스테르를 합성하기 위한 상용용매로는 3-알콜류와 글리콜 에테르류를 선정하여 검토하였다. 특히, 3-알콜류는 알코올기가 3차원적으로 위치하고 있어서 리파아제와 착화합물을 형성하지 못하므로 아실 수용체로는 작용하지 않는 것으로 보고되어 있는데, 예비실험의 결과, 2-메틸-2-프로판올과 2-메틸-2-부탄올이 다른 용매에 비하여 모노에스테르 합성에 효과적인 용매로 선정되었다.

Figure 2에 나타난 바와 같이 2-메틸-2-프로판올과 2-메틸-2-부탄올을 반응매질로 사용한 결과, 올레산의 전화율 및 메틸프록토시드 올레산 모노에스테르의 수율은 두 용매 모두 비교적 유사하게 나타났는데, 메틸프록토시드의 용해도가 60℃에서 2-메틸-2-프로판올의 경우 400g/L(최고 700g/L)이상으로 2-메틸-2-부탄올보다 약 4.5배에 상당하고, 비점이 82.4℃로 2-메틸

Table 2. Comparison of physical properties of methyl fructoside to other sugars(20, 21).

Sugar	Melting point(℃)	Decomposition temperature(℃)	Solubility		No. of HG or AcG <sup>a</sup>	No. of PA or Ac <sup>b</sup>	RA <sup>c</sup> (%)
			(25℃, g/g-H <sub>2</sub> O)	(25℃, g/g-MeOH)			
Sucrose	187~200	187	2.07	0.0127	8	3	37.5
Sucrose octaacetate	89	>285	0	0.09	8	3	37.5
Sorbitol	110~112	-	2.7	-	6	2	33.3
Glucose	146~155	146	1.04	0.0106	5	1	20
Methyl glucoside	168	-	1.08	0.052	4	1	25
Fructose	103~105	103	3.37~4	0.091	5	2	40
Methyl Fructoside	>40	-	>10(Sol)	>10(Sol)	4	2	50

a : number of hydroxyl group or acetyl group

b : number of primary hydroxyl group for acylation

c : reactivity of primary acylation = (b/a) × 100

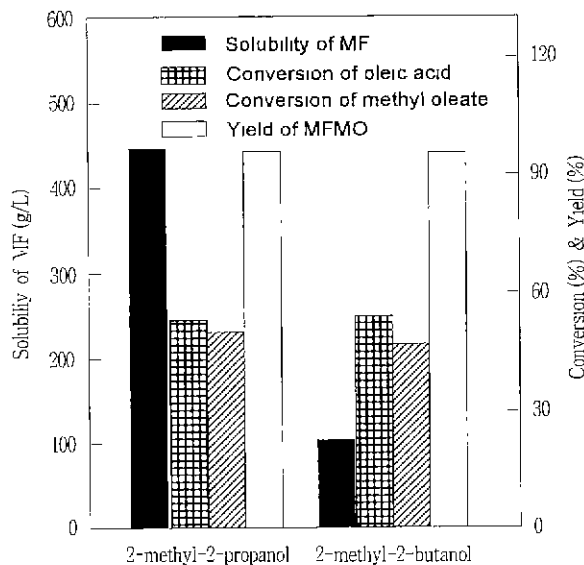


Figure 2. Comparison of reaction media in lipase-catalyzed monoacylation of methyl fructoside.(MF : methyl fructoside, MFMO : methyl fructoside monooleate.) Reaction conditions : see the materials and methods.

-2-부탄올(102.5℃)보다 낮으며 식품 안정성면에서도 유리하므로 2-메틸-2-프로판올을 최적 상용용매로 선정하였다

아실 공여체의 영향

용매공정과 무용매공정에서 아실 공여체의 물리화학적 특성은 당의 용해도와 혼화도 및 반응수율 등에 영향을 미치므로 용매공정과 무용매공정에 대한 아실 공여체의 영향을 검토하였다. 특히, 무용매 공정은 직접 당과 지방산을 혼화하여야 하므로 당의 물성 못지않게 지방산의 물성 역시 반응물의 혼화에 영향이 큰 것으로 평가된다. 용매공정에서는 올레산과 올레산의 메틸 에스테르화물인 올레산 메틸 에스테르를 비교하였고, 무용매공정에서는 용융온도가 무용매공정에 합당한 팔미트산 메틸 에스테르와 스테아르산 메틸 에스테르를 선정하여 탄소수 16~18의 포화 지방산과 탄소수 18의 불포화지방산인 올레산 메틸 에스테르를 올레산과 함께 비교 검토하였다.

그 결과, Figure 2, 3에 나타난 바와같이 용매공정과 무용매공정 모두 올레산의 경우가 메틸 에스테르보다 전화율 및 수율이 우수한 것으로 나타났다.

무용매공정의 경우, 지방산의 알킬기수가 증가함에 따라서 전화율이 증가함을 알 수 있었고, 동일한 알킬기수에서는 포화지방산보다는 불포화지방산의 경우가 전화율이 높은 것으로 나타났다. 그 이유는 메틸 에스테르보다 지방산의 혼화성이 좋기 때문으로 생각되는데, 지방산은 구성분자의 말단에 카르복실기를 갖고 있어서 당분자의 수산기와 수소결합이 용이하여 리파아제와 착화합물을 이루었을 때에 활성점부근에 당분자가 쉽게 접근할 수 있도록 당을 유도하는 작용을 하지만, 메틸 에스테르의 경우에는 구성분자 말단의 카르복실기가 메틸기로 치환되어 있어서 당의 유도기능이 약화되므로 전화율이 낮은 것으로 판단된다

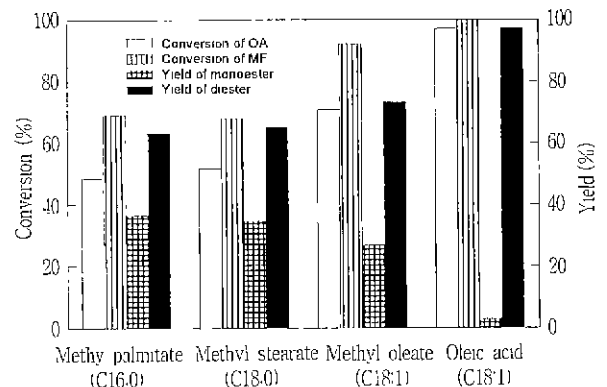


Figure 3. Substrate conversion and product yield in solvent-free, lipase-catalyzed diacylation of methyl fructoside with different acyl donors.(OA : oleic acid, MF : methyl fructoside) Reaction conditions : see the materials and methods.

따라서, 용매공정과 무용매 공정에서 메틸프록토시드 지방산 모노 및 디에스테르를 합성하기 위한 아실 공여체로는 올레산이 최적임을 확인하였다

최적 효소

당 지방산 에스테르 합성에 사용되는 효소로는 공업적으로 쉽게 이용할 수 있는 리파아제가 주로 이용되고 있다 리파아제는 그 기원에 따라서 입체 특이성, 위치 특이성 및 기질 특이성이 상이한 것으로 보고되어 있으므로 효소의 기원에 따라 당 지방산 에스테르의 반응 특이성과 수율 및 생산성이 다르게 나타날 수 있다.

따라서, 효율적인 당 지방산 에스테르의 효소적 합성공정을 제시하기 위해서는 이에 합당한 리파아제를 선정하여야 하므로, 공업적으로 쉽게 이용할 수 있는 여러 종류의 기원으로부터 유래한 리파아제를 선별하여 용매공정과 무용매공정에서의 에스테르 합성활성도를 측정하여 검토하였다.

2-메틸-2-프로판올을 상용용매로 하는 용매공정에서 *C. cylindracea*, *C. rugosa*, *A. niger*, *P. sp.*, *P. cepacia* 등의 자연 효소 등과 이들을 소수성 담체에 고정화시킨 각각의 고정화 효소들 그리고 지금까지 보고된 연구결과로부터 반응성과 안정성이 우수한 것으로 평가되고 있는 *C. antarctica* 기원의 고정화 리파아제인 Novozym 435와 *M. miehei* 기원의 고정화 리파아제인 Lipozyme 등에 대하여 아실화 활성도를 측정하여 비교하였다.

그 결과, Figure 4-a, 4-b에 나타난 바와같이 *C. rugosa*, *C. antarctica* 그리고 *M. miehei* 기원의 고정화 리파아제만이 충분한 아실화 활성을 나타내었고, 그 중에서도 Novozym 435가 가장 우수한 활성을 갖는 것을 알 수 있었다.

Novozym 435는 Novo-Nordisk사에서 host organism으로부터 *C. antarctica*를 선별하고 그 중에서 lipase B를 유전자 재조합 기술로 개량하여 아크릴수지에 고정화시킨 효소로서 최대 90℃ 이상에서도 90%이상의 아실화 활성을 나타내며, 60~80℃에서 최대활성을 갖는 열안정성이 매우 뛰어난 효소로 보고되어 있다 (18).

리파아제를 이용한 아실화 반응은 효소가 아실화하기 위한 전

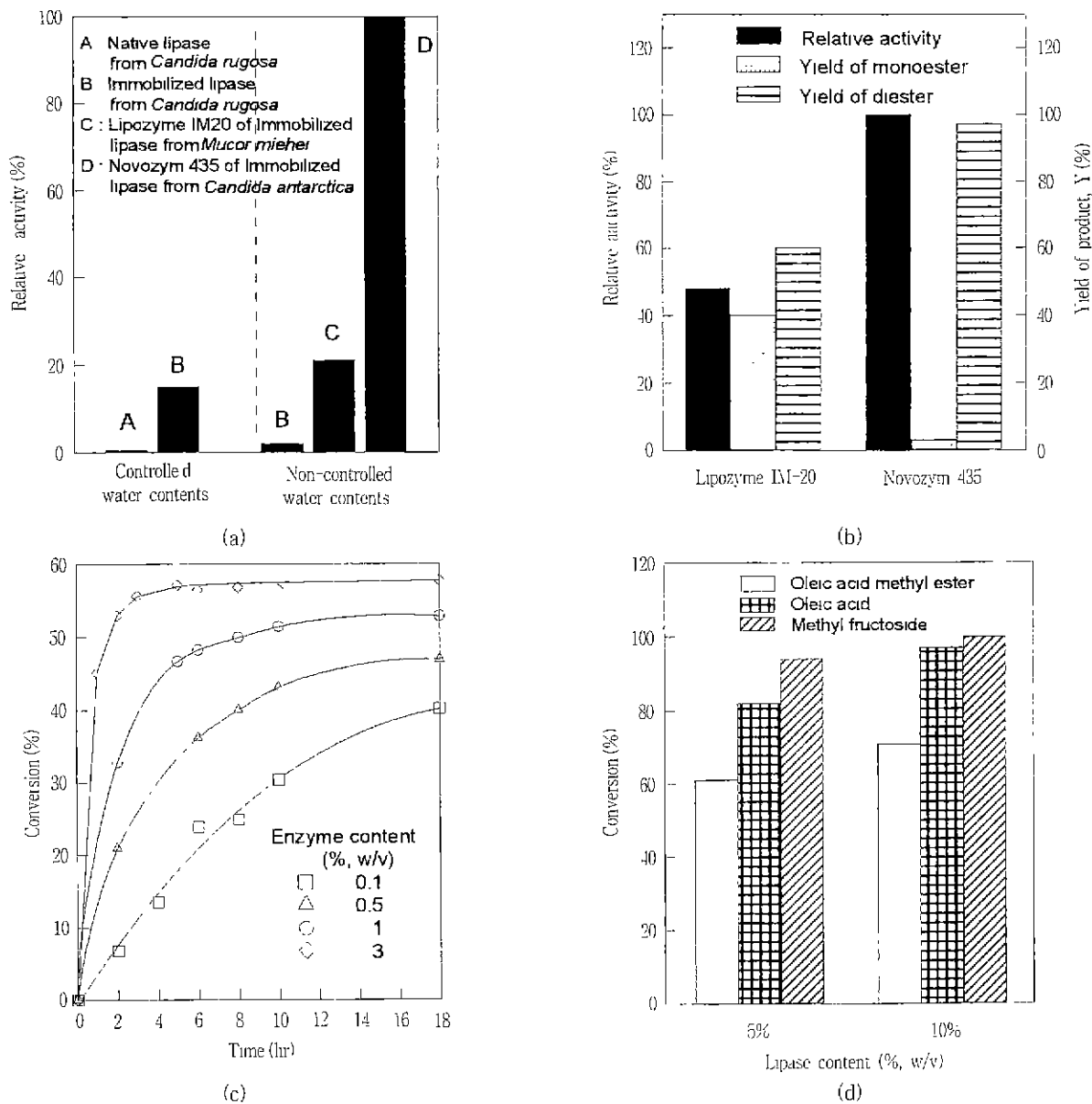


Figure 4. Relative activity of different lipases in lipase-catalyzed mono-acylation of methyl fructoside(a), relative activity and product yield of different lipases in lipase-catalyzed diacylation of methyl fructoside and oleic acid(b), effect of enzyme contents on conversion of oleic acid in lipase-catalysed mono-acylation of methyl fructoside and oleic acid(c), and effect of lipase contents on substrate conversion in lipase-catalysed diacylation of methyl fructoside(d)  
 Reaction conditions: see the materials and methods.

자 매개체로서 결합수(bound water)라고 하는 최소 기본량의 수분을 필요로 하는데(19), Novozym 435는 특별히 수분함량을 조절하지 않아도 가장 높은 아실화 활성도를 나타냄을 알 수 있어서 용매공정뿐만 아니라 무용매공정에서도 매우 우수한 효소촉매로 평가되었다. 특히, 무용매공정에서는 반응평형의 관점에서 진공조작에 의하여 반응으로부터 유리되는 수분을 효과적으로 제거하여야 하는데, Novozym 435는 진공에 의한 수분제거에 영향을 받지 않고 효소 활성이 유지되어 최대 활성도를 나타내었으며, 디아실화 수율이 98%이상으로 매우 높게 나타났다.

**최적 효소 함량**

당 지방산 에스테르의 효소적 합성공정은 효소촉매가 화학촉매에 비하여 그 활성도가 낮기 때문에 효소 비용의 비중이 크고 수율과 생산성이 낮아서 생산공정으로 발전되지 못하고 연구수준에 머물러 있다. 따라서 효율적인 효소적 생산공정이 제시되기 위해서는 효소촉매의 활성도가 충분히 높고 촉매함량이 경제적 관점에서 최적화되어야 하는데, Figure 4-a, 4-b의 결과로부터 Novozym 435는 메틸프루토시드의 아실화 효소로서 충분한 활성도를 가진 것으로 판단되었고, Figure 4-c, 4-d에 나타난 바와 같이 용매공정에서는 Novozym 435의 기준 활성도인

7000PLU(propyl laurate unit)를 기준으로 반응체적에 대하여 1%(w/v), 무용매공정에서는 기질의 질량에 대하여 10%(w/w)가 최적 효소 함량임을 알 수 있었다. 용매공정의 경우, 촉매의 함량이 증가할수록 올레산의 전화율이 증가함을 볼 수 있는데, 효소촉매의 함량이 3%이상부터는 함량이 높아 반응양식에 합당하지 못하며, 함량 1%에서도 충분히 생산성을 나타내므로, 함량 1%를 최적 효소 함량으로 선정하였다. 또한, Novo-Nordisk사에서도 Novozym 435의 최적함량을 기질의 질량에 대하여 10%로 제시하고 있으며, 용매공정에서의 최적함량인 1%는 기질의 질량을 기준으로 10%에 상응하므로 제조사의 권고(18)와도 잘 부합함을 알 수 있었다.

**반응 선택성과 최적몰비**

당 지방산 에스테르의 치환도는 당분자의 수산기와 지방산의 카르복실기가 에스테르 결합으로 아실화되는 수를 나타내는데, 4개의 수산기를 가지고 있는 메틸프룩토시드는 치환도 1과 2인 저치환도 에스테르와 3이상인 고치환도 에스테르를 합성할 수 있다. Figure 5와 Table 2에 나타난 바와 같이 메틸프룩토시드의 경우에 일반적인 당의 경우와 마찬가지로 아실화 반응성은 1급 알코올을 갖고 있는 1번과 6번 탄소의 수산기가 가장 크고, 3번과 4번 탄소의 순으로 평가된다. 효소적으로는 고치환도 에스테르를 생성할 수 없는 것으로 보고되어 있어서 메틸프룩토시드는 1번 탄소와 6번 탄소의 수산기만 반응에 참여할 수 있으므로, 1번 혹은 6번 탄소의 수산기가 모노아실화되거나 1번과 6번 탄소의 수산기가 함께 디아실화되어 모노에스테르나 디에스테르를 얻을 수 있다. 따라서, 메틸프룩토시드와 지방산의 이론적인 몰비는 각각 1:1과 1:2가 되는데, 1번과 6번 탄소의 수산기의 아실화 반응성이 유사하므로 입체광학적 관점에서 순수한 모노에스테르와 디에스테르를 각각 선택적으로 합성하기 위해서는 반응 선택성이 조절되어야 한다.

본 연구에서는 메틸프룩토시드에 대하여 친화력이 강한 상용 용매를 사용하여 메틸프룩토시드가 리파아제의 활성점에 접근할 때에 6번 탄소의 수산기는 활성점보다는 용매방향으로 배향되도록 하고 1번 탄소의 수산기만이 활성점과 착화합물을 형성될 수

있도록 선택성을 조절하여 모노에스테르는 용매공정으로 합성하였고, 디에스테르는 무용매공정으로 합성하였다.

Figure 6-a와 6-b에 나타난 바와 같이 메틸프룩토시드 올레산 디에스테르를 합성하는 무용매공정에서는 이론적인 몰비 1:2에서 최적 전화율을 나타냈으나, 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르를 합성하는 용매공정에서는 최적 몰비가 3:1로 나타났다. 용매공정에서 이론적인 몰비 1:1에서 전화율이 최대가 되지 않는 것은 메틸프룩토시드의 반응성과 상용용매에 의한 친화력에 기인한 것으로, 동물비에서는 벌크상에 존재하는 메틸프룩토시드가 상대적으로 친화도가 높은 지방산에 비하여 리파아제의 활성점으로 쉽게 접근하지 못하기 때문인 것으로 판단되며, 임계 몰비 이상에서는 메틸프룩토시드가 과량 존재하므로 올레산이 리파아제의 활성점으로 접근하기가 용이하지 못한것으로 생각된다. 따라서 순수한 모노에스테르를 합성하기 위해서는 지방산보다 많은 양의 메틸프룩토시드를 필요로 하며 수율과 전화율의 관점에서 최적화되어야 한다. 그러므로, 용매공정과 무용매공정으로 메틸프룩토시드 올레산 모노 및 디에스테르를 합성하기 위한 각각의 최적몰비는 3:1과 1:2이었다.

**메틸프룩토시드의 초기농도와 전화율**

일반적으로 기질의 초기농도는 생산성과 직결되므로 가능한 초기농도가 높을수록 높은 생산성을 얻을 수 있는데, 효소 반응계에서는 기질의 농도가 지나치게 높으면 기질 저해작용을 일으킬 수 있어서 생산성과 효소의 활성저해 관점에서 최적화된 초기농도를 결정하여야 한다.

당 에스테르 합성반응계에서 이용되는 효소는 리파아제이고 리파아제와 착화합물을 형성하는 기질은 지방산이므로 지방산의 초기농도에 대하여 그 영향을 검토하여야 한다. 그러나, 지방산의 농도는 당의 농도와 관련된 최적 몰비에 의하여 결정되며, 당 지방산 에스테르 합성반응계는 당의 용해도와 밀접한 관계가 있으므로, 일반적인 효소반응계와는 달리, 본 반응계에서는 당의 용해도 관점에서 초기농도를 평가하는것이 타당한것으로 판단된다. 또한 리파아제는 계면 반응효소로 유전상수가 작은 유기용매나 지방산에서 활성화되는것으로 보고되어 있어서, 본 반응계

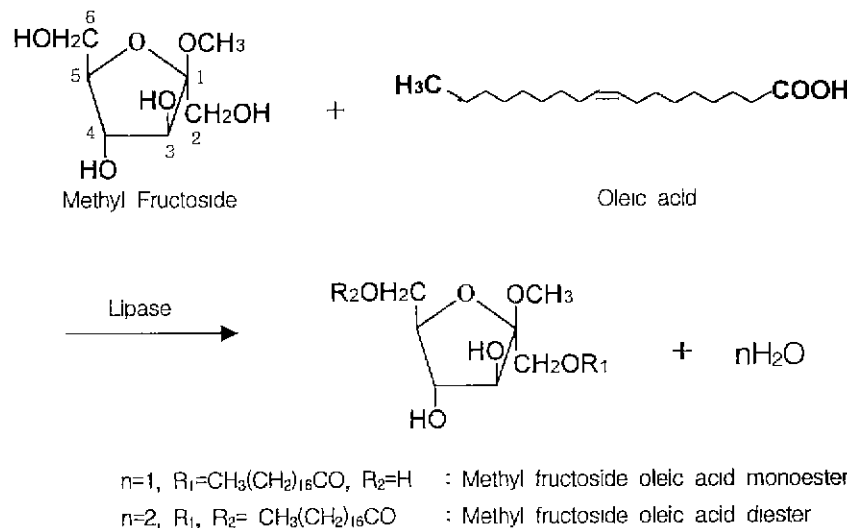
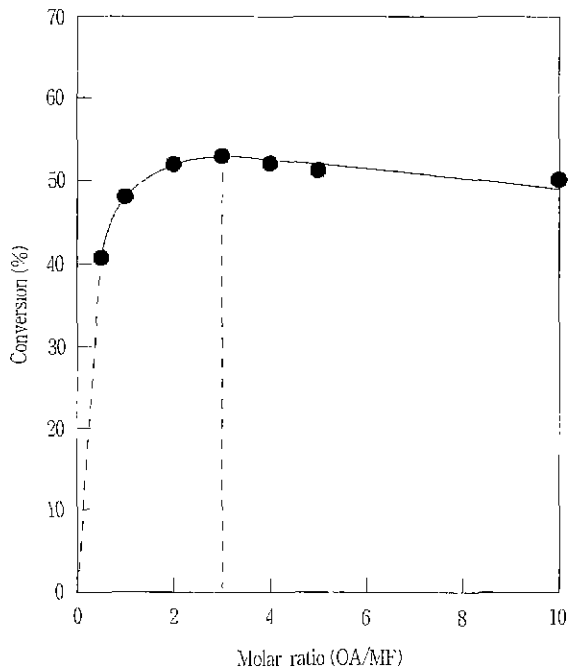
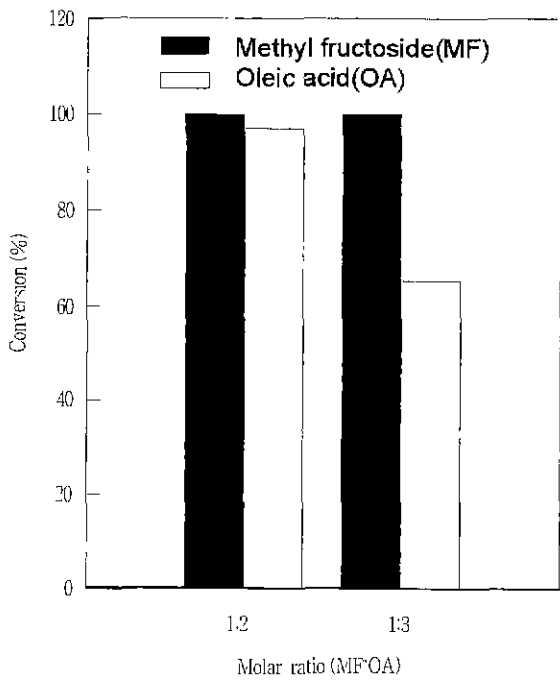


Figure 5. Lipase-catalyzed acylation of methyl fructoside with oleic acid.



(a)



(b)

Figure 6. Effect of molar ratio on conversion of oleic acid in lipase-catalyzed monoacylation of methyl fructoside and oleic acid(a) and effect of molar ratio on substrate conversion in lipase-catalyzed diacylation of methyl fructoside and oleic acid(b). Reaction conditions see the materials and methods.

에서 리파아제는 지방산의 농도변화에 대하여 심각하게 영향을 받지 않는것으로 평가되므로 당과 지방산의 몰비가 현저하게 차이가 나지 않는한 지방산에 대한 리파아제의 기질 저해반응을

평가하는것은 큰 의미가 없는것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서는 용매공정과 무용매공정에서 당의 초기농도에 따르는 전화율과 수율을 검토하여 전화율과 수율이 높으면서 생산성도 높은 당의 초기농도를 결정하였다.

무용매 공정에서는 용매를 사용하지 않고 당과 지방산을 혼합하므로 최적몰비와 최적효소함량이 결정되면 당의 초기농도는 이 범위 내에서 함께 결정되므로 특별히 초기농도의 의미를 지니고 있지 않다.

이에 반하여, 용매공정에서 당의 초기농도는 당의 용해도에 따라 결정되므로 당의 용해도를 높일 수 있어야 초기농도를 높일 수 있으며, 이에 따라서 생산성을 향상시킬 수 있다. 따라서 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르를 합성하기 위한 용매공정에서 메틸프룩토시드의 초기농도에 따른 전화율과 생산성을 검토하였는데, Figure 7-a에 나타낸 바와 같이 메틸프룩토시드의 초기농도가 증가함에 따라서 평형전화율이 증가하였고, 150~200g/L 부근에서 더 이상 증가하지 않았는데, Figure 7-b에 나타난 바와 같이 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르의 농도는 계속적으로 증가하고 있으며, Figure 7-c에 나타난 바와 같이 그 수율이 90%이상 양호하게 나타나 최적 초기농도는 200g/L로 결정하였다

당 지방산 에스테르 합성반응에서 메틸프룩토시드가 지방산으로 아실화될때에 물분자가 유리되는데 아실화 반응이 비가역적으로 지속되기 위해서는 유리된 물분자를 효과적으로 제거하여야 한다. 무용매공정에서는 적절한 진공도를 유지하므로써 비가역적 아실화 반응을 유지시켜 90%이상의 높은 전화율을 얻을 수 있으나, 용매공정에서는 유리된 물분자가 반응매질에 내재하여 아실화 반응의 역반응인 가수분해반응이 일어나므로 평형전화율이 존재하게 되고 무용매공정에 비하여 상대적으로 낮은 생산성을 갖게된다. 따라서, 용매공정에서 반응 평형을 합성반응쪽으로 이동시켜 높은 전화율을 얻기 위해서는 유리된 물의 활동도를 저하시켜야 하는데, 이 역시 당의 농도를 높게 유지함으로써 가능하다.

Figure 7-d에 나타낸 바와 같이 본 연구에서 제시된 무용매공정은 반응온도 70°C에서 메틸프룩토시드의 연화점이 낮아 올레산과 졸상태로 충분히 혼합되었고, 진공도 20~200mmHg에서 효과적으로 수분이 제거되어 반응시간 10시간만에 98%이상의 높은 전화율을 얻을 수 있었다. 용매공정에서는 메틸프룩토시드의 용해도가 다른 당에 비하여 매우 높기 때문에 쉽게 물의 활동도를 낮출 수 있어서 Figure 7-a, 7-b의 연구결과와 같이 메틸프룩토시드의 초기농도 200g/L에서 수율 90%이상, 최대 평형전화율 70%에 도달할 수 있었으며 메틸프룩토시드 올레산 모노에스테르의 농도가 100g/L에 상당하여 지금까지 보고된 연구결과와 비교하면 모노에스테르의 경우는 최저 14배에서 최고 120배 이상, 디에스테르의 경우는 2배 이상 높게 나타났다.

**메틸프룩토시드 올레산 에스테르 생산성**

효소적 합성법은 화학적 합성에 비하여 당의 분해와 탄화물막을 수 있고, 금속비누를 사용하지 않으며, 효소특성에 따라서 위치특이성과 입체 특이성을 자유자재로 조절할 수 있어서 다양한 기능을 갖는 당 에스테르를 생산할 수 있다. 그리고, 생체친화성과 환경친화성이 높아 독성과 환경오염을 방지할 수 있고, 반응단계가 단순하여 분리 및 정제 비용을 절감할 수 있다는 장



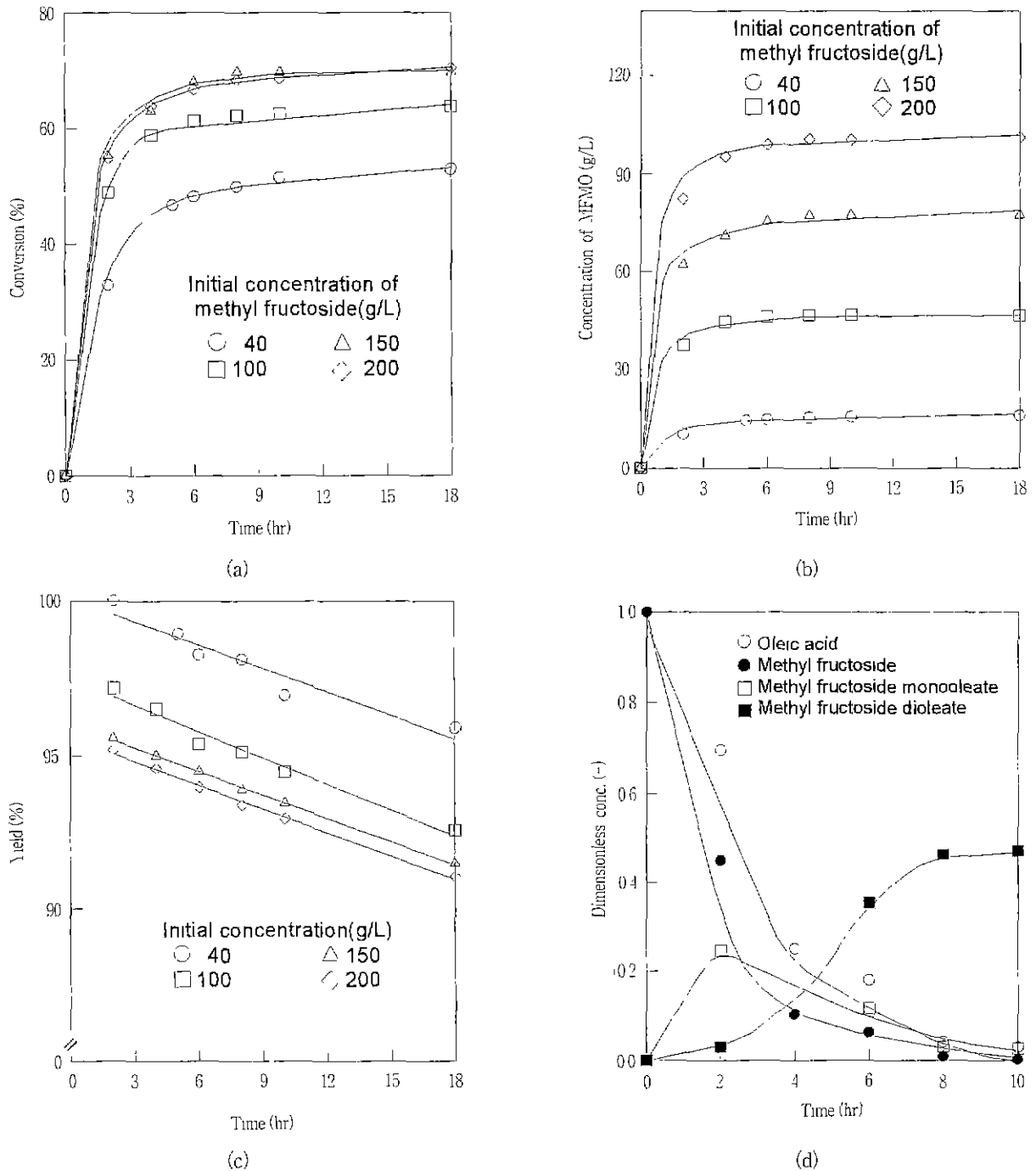


Figure 7. Effect of initial concentration of methyl fructoside on conversion of oleic acid(a), monoester concentration(b), and yield of monoester(c) in lipase-catalyzed monoacylation of methyl fructoside and oleic acid, and transient concentration profiles in lipase-catalyzed diacylation of methyl fructoside and oleic acid(d)(MFMO : methyl fructoside monooleate). Reaction conditions : see the materials and methods.

점을 갖고 있다. 그러나, 당분자의 물리적 성질에 따라서 반응계가 좌우되는 근본적인 어려움을 갖고 있는 실정이다.

당 지방산 에스테르 합성 반응계의 수율과 생산성을 높이기 위해서는 친수성이 강한 당과 소수성이 강한 지방산을 완전히 혼화하여 효소와 효과적으로 기질 착화합물을 형성할 수 있도록 안정된 균일상을 이루어야 한다. 그러나 용매공정의 경우, 두 성

분을 수율과 생산성의 관점에서 높은 농도로 충분히 혼용할 수 있는 용매를 선정하기가 어려우며 대부분의 상용용매들이 독성이 강하여 생성물의 식품 안전성뿐만 아니라 근본적으로 효소촉매의 활성에 큰 영향을 미치고 있는 것으로 나타나므로 당의 용해성이 반응매질의 선정에 중요한 변수가 되고 있다. 또한, 무용매 공정의 경우 대부분 당의 용융온도가 효소촉매의 불활성화

Table 3 lipase-catalyzed acylation of sugar with fatty acid.

Type of Sugar base	Enzyme source	Reaction medium	Reaction temperature (°C)	Enzyme contents (%w/v) /Reaction time(hr)	Acyl donor	Acyl acceptor	Initial conc of sugar (g/L)	Molar ratio <sup>a</sup>	Conversion (%) <sup>b</sup>	Ester productivity (g/L-hr)	Remarks
Glucose	Novozym 435	t-amyl alcohol	60 (75mmHg <sup>c</sup> )	1 /24	oleic acid	sorbitol	10	10:1	99	0.983	Ducret et al. (22)
	immobilized <i>C. antarctica</i>	acetonitrile	70	5 /24	caprylic acid	glucose	83(insoluble)	1:12	99	0.583	Ljunger et al. (23)
	Lipase sp382 <sup>d</sup>	benzene/pyridine mixture(2:1)	55	1 /48	methyl oleate	methyl- $\alpha$ -D-glucoside	8	1:4	76.5	0.113	Mutua & Akoh (11)
	Novozym 435 <sup>e</sup>	acetonitrile	45	0.83 /24	caprylic acid	methyl- $\beta$ -D-glucoside	8.4(insoluble)	1:11	90	0.521	Cordova et al. (24)
	Immobilized <i>C. antarctica</i> lipase B	solvent-free	70 (75mmHg)	6 /24	C8-C18 fatty acid	Methyl- ethyl-propyl-, butyl- glucoside	-	1:135	95	57	Bjorkling et al. (6)
Fructose	Lipozyme <sup>f</sup> /FBR <sup>g</sup>	t-amyl alcohol	55	18 /16	oleic acid	fructose	10	1:10	83 <sup>h</sup>	1.35	Khaled et al. (25)
	Lipozyme JM60	n-hexane	60	1 /12	stearic acid	fructose/PBA <sup>i</sup>	54	3:1	40	0.15	Schlatterbeck et al.(12)
	Lipozyme JM20, Lipase sp382	t-butanol	40	2 /48	stearic acid	fructose/PBA <sup>i</sup>	18	1:1	10~24	0.1~0.2	Oguntmeim et al. (26)
	Lipozyme	t-amyl alcohol, n-hexane	55	1 /24	lauric acid	fructose/PBA <sup>i</sup>	8	1:15	55	0.371	Scheckermann et al.(27)
	Novozym 435	t-butanol	60	1 /8	oleic acid	methyl- $\beta$ -D-fructoside	300	3:1	70	126 (monooleate)	present work
	Novozym 435	solvent-free	70 (20mmHg)	10 /8~10	oleic acid	methyl- $\beta$ -D-fructoside	-	1:2	99.7	140 (dioleate)	"

a : Molar ratio of acyl acceptor to donor

b : Based on limiting component.

c : Reaction medium was refluxed with 3Å-molecular sieve.

d : Immobilized lipase from *Candida sp* and the trademark of Novo nordisk bioindustrials Inc.

e : Immobilized lipase from *Candida antarctica* and the trademark of Novo nordisk bioindustrials Inc.

f : Immobilized lipase from *Mucor miehei* and the trademark of Novo nordisk bioindustrials Inc.

g : Fixed-bed reactor containing 200g of Lipozyme.

h : Conversion of 10 hour recycling with molar ratio adjusted after 50% of equilibrium conversion reaching for 6hrs.

i : Complex by phenylboronic acid with molar ratio of PBA to sugar is 1.5:1.

온도를 초과하므로 열 안정성이 우수한 촉매를 개발한다고 하여도 당의 용융온도를 적절히 낮추지 못한다면 효소촉매의 이용이 제한될 수밖에 없는 것으로 판단된다.

현재 당 지방산 에스테르의 효소적 합성에 이용되고 있는 당들은 주로 포도당과 솔비톨 및 과당을 들 수 있는데, 대부분 당분자의 용해도가 낮고 연화점이 높아서 실제적으로 당 지방산 에스테르의 효소적 합성법에는 적합하지 못한 것으로 생각된다. 따라서, 효소를 이용한 당 에스테르 합성의 문제해결의 관건은 우수한 용해도를 갖는 당원을 개발하여 적절한 용매에서 충분히 용해도를 향상시킬 수 있으며, 연화점이 낮아 무용매 공정에서 지방산과 효소촉매와의 혼화도가 높고 효소의 활성이 충분히 유지될 수 있어야 한다.

이러한 관점에서, 본 연구에서는 용해도가 높고 연화점이 낮으며 지방산과의 혼화성이 우수하여 기존의 생산공정과 다른 연구자들의 기술적 문제점을 근본적으로 해결할 수 있는 메틸프루

토시드를 이용하여 메틸프루토시드 올레산 에스테르를 용매공정과 무용매공정을 이용한 효소적 합성법으로 합성하였고, 최적 반응조건을 제시하였다.

Table 3에는 지금까지 보고된 연구결과를 본 연구에서 제시한 메틸프루토시드 올레산 에스테르 합성공정의 결과와 비교 평가하였다. 주된 비교인자는 당의 용해도이며 이에 따른 전환율과 수율을 비교하면 그 차이를 명백히 할 수 있다. 에스테르 생산성의 경우, 본 연구는 반응시간 8시간만에 메틸프루토시드 올레산 모노에스테르의 생산성이 12.6g/L-hr이었고, 반응시간 10시간만에 메틸프루토시드 올레산 디에스테르의 생산성은 지방산을 기준으로 140g/L-hr라는 높은 생산성을 얻었으며, 지금까지 보고된 연구결과와 비교하여 모노에스테르의 경우는 최저 14배에서 최고 120배 이상, 디에스테르의 경우는 2배 이상의 우수한 생산성을 나타내었다. 이와같은 결과는 메틸프루토시드의 용해도와 연화도뿐만 아니라 반응성이 우수하였기 때문으로,

당의 초기농도를 다른 연구자들의 결과와 비교해 보면, 최저 10 배에서 최고 37배나 높아 실제적인 상업화가 가능한것으로 판단 된다.

따라서, 본 연구는 메틸프록토시드를 이용한 새로운 과당계열의 당 지방산 에스테르를 합성하여 메틸프록토시드가 당 에스테르 합성공정에 유용한 당원으로 이용할 수 있음을 제시하였고, 이를 바탕으로 경제성있는 상업적 생산공정으로 활용될 수 있는 가능성과 결과를 제시하였다.

## 요 약

과당계열 배당체인 메틸프록토시드를 반응출발물질로하여 과당계열 당 지방산 에스테르인 메틸프록토시드 올레산 모노 및 디에스테르를 효소적 용매 및 무용매공정에 의하여 합성하였다.

용매공정으로부터 메틸프록토시드 올레산 모노에스테르를 합성한 결과, 최적 상용용매로는 2-메틸-2-프로판올이 우수하게 나타났으며 메틸프록토시드의 용해도는 60℃에서 400g/L 이상에 상당하였다. 최적반응조건을 검토한 결과, 메틸프록토시드와 올레산의 최적몰비 3:1, 메틸프록토시드의 최적 초기농도 200g/L, Novozym 435의 최적 촉매함량 1%(w/v), 반응온도 60℃에서 반응시간 8시간만에 70%의 평형 전환율에 도달하였으며 12.6g/L-hr의 생산성으로 메틸프록토시드 올레산 모노에스테르를 생산할 수 있었다.

그리고, 무용매공정에서 메틸프록토시드 올레산 디에스테르를 합성한 결과, 메틸프록토시드와 올레산의 최적몰비 1:2, Novozym 435의 최적 촉매함량 10%(w/w), 반응온도 70℃, 진공도 20~200mmHg에서 반응시간 10시간만에 95%이상의 전환율로 140g/L-hr의 생산성으로 메틸프록토시드 올레산 디에스테르를 생산할 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구비로 이루어졌으며 연구비를 지원해 주신 관계기관에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Akoh, C. C (1995), Lipid-Based Fat Substitutes, *Food Sci and Nutr.*, **35**, 405-430.
- Kosaric, N.(1993), *Biosurfactants*, p 373, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
- Giese, J.(1996), Fats, Oils, and Fat Replacers, *Food Technology*, **50**, 78-83
- Balcao, V. M., A. L. Parva, and F. X. Malcata(1996), Bioreactors with Immobilized Lipases : State of THE Art, *Enzyme Microb Technol*, **18**, 392-416.
- Castillo, E., A. Marty, D. Combes, and J. S. Condoret (1994), Polar substrates for enzymatic reactions in supercritical CO<sub>2</sub> : How to overcome the solubility limitation, *Biotechnol. lett* **16**, 169-174.
- Bjorkling, F., S. E. Godtfredsen and O. Kirk(1989), A Highly Selective Enzyme -catalysed Esterification of Simple Glucosides, *J. Chem. Soc Chem. Commun.*, 934-935.
- Wong, D. W. S(1995), *Food Enzymes : Structure and Mechanism*, p170, Chapman & Hall, N. Y..
- Hawram, A. S., K. M. Moreton, R. B. A. R. Sessions, Clarke, and J. J. Holbrook(1994), "Engineering Surface Loops of Proteins-A Preferred Strategy for Obtaining New Enzyme Function", *TIBECH*, **12**, 207-215.
- Blanch, H. W. and D. S. Clark(1991), *Applied Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc, N. Y
- Adelhorst, K., F. Bjorkling, S. E. Godtfredsen, and O. Kirk(1990), Enzyme Catalysed Preparation of 6-O-Acylglucopyranosides, *Synthesis*, **2**, 112-115
- Mutua, L. N and C. C. Akoh(1993), Synthesis of Alkyl Glycoside Fatty Acid Esters in Non-aqueous Media by *Candida sp* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 43-46.
- Schlotterbeck, A., S. Lang, V. Wray, and F. Wagner (1993), Lipase-catalyzed Monoacylation of Fructose. *Biotechnol. Lett.*, **15**, 61-64.
- Fregapane, G., D. B. Sarnev, and E. N. Vulfson(1991), Enzymic solvent-free synthesis of sugar acetal fatty acid esters, *Enzyme Microb Technol.*, **13**, 796-800.
- 김해성, 김우식(1993), Alginate-enclosed Microspheres를 이용한 배당체 합성에 관한 연구, *한국생물공학회지*, **8**(4), 320-327.
- 허주형, 김해성(1995), Alginate-enclosed microspheres를 이용한 메틸프록토시드의 연속생산공정, *한국생물공학회지*, **10**(2), 159-165.
- 허주형, 유인상, 김해성(1996), 액체크로마토그래피에 의한 메틸프록토시드의 분리공정연구, *한국생물공학회지*, **11**(5), 529-535.
- 허주형, 김해성(1993), 고정화 전환효소를 의한 메틸 프록토시드의 합성, *한국생물공학회지*, **8**(4), 313-319.
- Novo Nordisk A/S, Enzyme Process Division(1997), Product Sheet : Novozym 435, Novo Nordisk
- Zarevucka, M., M. Rejzek, M. Hoskovec, A. Svatos, Z. Wimmer, B. Koutek, and M. -D. Legoy(1997), Initial Water Content and Lipase-Mediated Ester Formation in Hexane, *Biotechnol. Lett.* **19**, 745-750.
- Haraguchi, Y., A. Yagi, A. Koda, N. Inagaki, K. Noda, and I. Nishioka(1982), A Specific Inhibitor of IgE-Antibody Formation : n-Pentyl-β-D-Fructopyranoside, *Am. Chem. Soc.*, **25**, 1495-1499
- Hirai, S., S. Rokuhara, and S. Shimizu(1986), Formation of Methyl and Ethyl β-D-Fructofuranosides in Aqueous Methanol and Ethanol Extracts of Japanese Persimmon Fruits, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **60**, 521-523
- Ducret, A., A. Giroux, M. Trani, and R. Lorite(1995), Enzymatic Preparation of Biosurfactants from Sugars or Sugar Alcohols and Fatty Acids in Organic Media Under Reduced Pressure, *Biotech. and Bioeng*, **48**, 214-221.
- Maag, H.(1984), *Fatty Acid Dervivatives : Important Su-*

- rfactants for Household, Cosmetic and Industrial Purposes, *JAOCs*, **61**, 259-267.
24. Codova, A., K. Hult, and T. Iversen(1997), Esterification of Methyl Glycoside Mixtures by Lipase Catalysis, *Biotechnol. Lett.*, **19**, 15-18.
25. Khaled, M., D. Montet, M. Pina, and J. Graille(1991), Fructose Oleate Synthesis in A Fixed Catalyst Bed Reactor, *Biotechnol. Lett.*, **13**, 167-172.
26. Oguntimem, G B, H. Erdmann, and R. D. Schmid(1993), Lipase Catalysed Synthesis of Sugar Ester in Organic Solvents, *Biotechnol Lett*, **15**, 175-180.
27. Schedkermann, C., A. Schlotterbeck, M. Schmidt, V. Wray, and S Lang(1995), Enzymatic Monoacylation of Fructose by Two Procedures, *Enzyme Microb Technol.*, **17**, 157-162.