

전분을 기질로 한 二相系에서 Amylase의 당전이반응에 의한 배당체의 합성

박종이 · 이재등 · 장경립 · 이태호*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

α -Amylase의 당전이반응에 의해 가용성전분으로부터 benzylalcohol- α -glucoside(BG)를 합성하였다. 이때 glycosyl기의 공여체인 가용성전분 1%, glycosyl기의 수용체인 benzylalcohol 90%, pH 5.0의 0.1 M citrate 완충액 10%, *Aspergillus oryzae* 유래의 α -amylase 10 unit를 함유하는 二相系(water-organic two phase)에서 당전이반응이 가장 효율적으로 일어났으며 40°C, 80시간 정도의 반응에서 전분 10 mg으로부터 약 4 mg의 BG가 합성되었다. 합성초기에는 benzylalcohol- α -maltoside(BM)가 주로 생성되다가 반응시간이 경과함에 따라 이는 가수분해되고 최종적으로는 BG만이 생성되었다. 합성물질은 모두 환원력이 없고 α -glucosidase에 의해 가수분해되었으며 ESI-Mass에 의해 분자량이 각각 270, 432로 측정되어 그 구조가 BG, BM임을 확인하였다.

KEY WORDS □ benzylalcohol- α -glucoside, glycoside, transglycosylation in two phase

특정 물질의 합성에 선택적 촉매제로서 효소의 중요성이 재인식되고 있고, 효소반응이 수계에서 뿐만 아니라 비수계(非水界)에서도 가능하다는 사실이 입증됨에 따라 효소의 이런 특수한 기능을 이용한 신물질의 합성이 활성화되기 시작하였다(4, 15). 초기에는 주로 esterase, lipase, oxidase 및 hydrogenase 등의 효소가 가지는 기질 선택성(substrate selectivity), enantioselectivity 또는 regioselectivity(11, 24, 25) 등의 특수 성질이 고가의 chiral 전구체, 항생물질 중간체, 탄수화물계의 의약품 및 고분자 화합물 등의 합성에 이용되어 왔으며, 최근에는 이들 외에도 여러 종류의 효소들을 이용한 고부가가치의 물질생산이 가능하게 되었다. 특히 종래의 유기합성법으로는 조제가 곤란했던 이성체를 이들 효소로 쉽고 간단하게 생산할 수 있다는 사실이 밝혀지면서, 효소를 이용한 특정물질의 선택적 합성이 시도되어(1, 9, 12), 이들에 의한 신물질의 합성이 크게 주목을 받기 시작하고 있다. 현재 이와 같은 반응으로는 lipase, esterase, protease 등에 의한 가수분해 반응의 역반응 및 에스테르 교환반응(16), 당가수분해효소인 glycosidase, galactosidase, amylase 등에 의한 기능성 당의 합성 및 transglycosylation 반응(14) 등 많은 경우가 알려져 있다. 당은 functional group, 즉 hydroxyl기를 가지기 때문에 transglycosylation, alkylation, reverse hydrolysis 반응 등의 기질로 자주 사용되며, 그 예로서 porcine pancreatic lipase에 의한 glucose의 acylation 반응, β -glucosidase의 transglycosylation, 또는 reverse hydrolysis 반응에 의한 cellobiose의 alkylation 반응이 확인되고 있다(6, 25, 28). 당을 기질로 하여 합성되는 배당체 화합물은 거기에 결합된 aglycon의 종류에 따라 다양한 성질을 가지

게 되며, 이들은 주로 계면활성제, 기능성 식품, 변성제(denaturant), 유연제(plasticizer), 식품 첨가물, 항생제, 생리활성물질 등으로 광범위한 용도를 나타내는 것으로 알려져 있다(8, 10, 13, 18, 31).

본 연구실에서는 수계 혹은 비수계 용매에서 종래의 효소 반응과는 그 특성이 다른 새로운 반응을 유도하여 보다 부가가치가 높은 신물질의 합성에 초점을 맞추어 연구를 계속하고 있으며 이미 유기 용매계에서 lipase에 의해 계면활성능이 우수한 당 acyl 화합물을 합성하여 그 구조와 기능을 밝힌 바 있다(19~22). 이하의 내용은 이와 같은 연구의 일환으로 다당 가수분해효소인 α -amylase의 transglycosylation 반응을 二相系(water-organic two phase)에서 행하여 starch로부터 배당체(glycoside)를 합성한 연구결과이며, 이때의 물과 유기용매간의 최적비율 및 반응산물의 구조를 확인한 결과 등에 대해 기술하고자 한다.

재료 및 방법

사용시약 및 기기

α -amylase(*Aspergillus oryzae* and *Bacillus* sp.), α -glucosidase 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다. Soluble starch는 Yachuri Pure Chemicals Co., LTD.(Japan) 제품을, benzylalcohol은 Aldrich(U.S.A)사 제품을 사용하였다. 당과 반응산물은 HPLC(Waters, U.S.A)의 Sugar pak column(Waters, U.S.A)으로 정량하였으며 합성된 glycoside의 분자량은 ESI-MASS(V. G. Quattro., England)로 측정하였다.

반응용매계

Benzylalcohol과 전분을 기질로 하여 α -amylase의 transglycosylation 반응으로 배당체를 합성하기 위해 기질간의 반응

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 051-510-2267, Fax : 051-583-0134
E-mail : leeth@hyowon.pusan.ac.kr

비율을 설정하였다. 즉 효소반응이 최대가 되는 이상계의 비율을 설정하기 위해 기질인 benzylalcohol의 농도를 달리 하여 효소반응을 행하였다. *Aspergillus oryzae* 유래의 α -amylase는 작용최적 pH가 5 근방이기 때문에 0.1 M citrate buffer(pH 5.0)에 가용성 전분과 효소를 용해하여 반응계에 첨가하고 배당체의 생성여부를 조사하였다. 이때의 반응계의 액량은 1 ml이고, starch는 10 mg/ml, 효소량은 10 unit를 첨가하였으며 benzylalcohol의 양은 0%에서 100%까지로 변화시키면서 반응을 행하였다. 효소반응은 40°C, shaking water bath에서 3일간 행하였으며 반응 후 가열에 의해 반응을 정지시키고 원심분리하여 침전부분을 제거시킨 후 배당체의 생성량을 HPLC로 정량하였다.

반응산물의 분석

Starch와 benzylalcohol의 transglycosylation 반응에서 생성된 산물을 확인하기 위하여 반응중의 시료를 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 정지시키고, 원심분리한 후 적정량의 시료를 TLC 및 HPLC로 분석하였다. 전개용매는 chloroform:acetic acid:water(3:3.5:0.5)를 사용했으며, 발색에는 glycolipid 발색시약인 diphenylamine:aniline:phosphoric acid(5:5:1)와 sulfuric acid:methanol(50:50)을 사용하였다. TLC로 반응산물을 확인한 후 HPLC로 물질을 정량하였다. HPLC조건은 다음과 같다; column, Sugar pak; mobile phase, water; flow rate, 0.8 ml/min; detector, Waters 410 differential refractometer; temperature, 85°C, 정량분석에서는 internal standard로 fructose를 이용하였다.

반응산물의 정제 및 확인

α -amylase에 의해 starch와 benzylalcohol로부터 합성된 glycoside의 구조 및 물성을 조사하기 위해 이를 정제하였다. 1%의 starch와 10 unit의 효소, 90%의 benzylalcohol, 10%의 0.1 M citrate buffer solution(pH 5.0)으로 구성된 반응액을 40°C shaking water bath에서 20시간 반응시킨 후 10,000 rpm, 10분 동안 원심분리하여 불용성 부분을 제거한 후 감압농축에 의해 benzylalcohol을 제거하였다. 농축액은 2배 volume의 chloroform으로 2회 추출하여 잔여 benzylalcohol을 제거하고, 다시 2배 분량의 ethanol을 첨가하여 oligo당과 잔존효소를 침전, 제거시켰다. 상등액은 건조 후 전개용매 1 ml에 용해한 후 Silicagel G60으로 column chromatography(column; 2.5×70 cm, flow rate; 30 ml/hr, fraction volume; 3 ml)를 행하였다. 이때 전개용매로는 chloroform/methanol(80/20, V/V)을 사용하였다. 정제물질의 순도는 HPLC로 검증하였다. 정제가 확인된 glycoside는 그 구조를 확인하기 위해 ESI(Electron Spray Ionization)-MASS로 분자량을 결정함과 동시에 α -glucosidase, α -amylase에 의한 가수분해여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

이상계의 설정

α -Amylase의 transglycosylation 반응에 의해 glycoside를 합성할 때 glucose의 공여체인 전분의 농도 뿐만 아니라 이

Table 1. Effect of benzylalcohol content for the synthesis of benzylalcohol- α -glucoside from soluble starch by α -amylase in water-organic two phase system

Benzylalcohol (%)	Benzylalcohol- α -glucoside (mg/ml)
0	0
5	1.3
10	1.3
20	1.3
30	1.3
40	1.1
50	1.1
60	1.4
70	1.6
80	1.6
85	2.9
90	3.7
95	0.1
100	0

The reaction mixture containing 10 mg starch, the concentration of benzylalcohol as indicated, and 10 unit enzyme in 1 ml was incubated at 40°C in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0). After 3 days reaction, the glycoside synthesized was measured by HPLC.

의 수용체인 benzylalcohol의 농도가 중요할 것으로 판단된다. 따라서 우선 전분의 농도를 고정하고 benzylalcohol의 농도를 달리하여 glycoside의 생성여부를 검토하였다. 그 결과(Table 1) 반응계의 수분함량이 높을 때보다 낮을 때에 glycoside의 생성량이 높게 나타남을 알 수 있다. 즉 glucose의 수용체인 benzylalcohol의 농도가 높아지면 transglycosylation 반응이 촉진되는 경향을 보였다. 이 경우 benzylalcohol의 농도가 90%일 때 최대가 되어 그 이후의 농도에서는 오히려 감소하는 것으로 나타났다. Benzylalcohol 농도가 100%인, 즉 효소와 전분을 용해시키지 않고 유기용매에 완전히 분산시켜 반응시킬 때에는 transglycosylation반응이 전혀 일어나지 않는 것으로 나타났다. 보통 효소반응은 수계, 이상계, 유기용매계로 나눌 수 있으나 이들의 구분은 확실하게 규정지을 수는 없다. 즉 이 반응에서도 benzylalcohol이 물에 5% 정도 용해되기 때문에 이 농도 이하를 수계, 그 이상의 농도를 이상계, 95% 이상에서는 유기용매계라고도 할 수 있으나 그 경계가 불확실하기 때문에 반응계를 확실하게 구분하는 것은 불가능하다. 그러나 본 실험의 경우 benzylalcohol 90%, 수분 10%의 반응계에서 transglycosylation 반응이 최대가 되고 반응용매가 두 층으로 구분되기 때문에 이를 이상계라고 할 수 있을 것 같다. 따라서 이후의 실험은 이 농도의 이상계에서 효소반응을 행하였다. 한편 수계에서도 효소반응이 비교적 잘 일어나고 또한 수분의 함량이 높기 때문에 이상계에 비해 전분 및 효소의 가용화를 증대시킬 수 있어 반응효율을 무시한다면 반응산물의 양을 높일 수는 있을 것으로 판단되었다. 따라서 수계에서의 반응양상에 대해서도 연구를 진행중에 있다.

본 실험에서는 반응 3일 후의 product에 benzylalcohol- α -glucoside만이 검출되고 다른 종류의 배당체는 전혀 검출되지 않고 있다. 일반적으로 α -amylase는 전분을 불규칙하게 가수분해하는 것으로 알려져 있어 이 경우 반응산물에 여러

종류의 배당체가 존재할 것으로 생각되었으나 실제 한 종류만의 배당체만이 검출되었다. 그러나 이와 같은 현상은 후술하는 바와 같이 반응초기에 다른 종류의 glycoside도 합성되다가 시간이 경과함에 따라 다시 분해되어 최종적으로 BG만이 생성되는 것으로 나타났다.

이때 전분의 농도를 1%로 고정할 것은 가용성 전분을 일 단 완충액에 용해하여 반응계에 첨가해야만 효소반응이 일어난다는 것이 확인되었기 때문에 benzylalcohol의 농도가 극단적으로 높을 때를 감안하여 일률적으로 같은 농도로 하였다. 즉 benzylalcohol의 농도가 높을 때에는 수분의 함량이 적기 때문에 고농도의 전분 및 효소의 용해가 어려워져 이 이상의 농도로의 첨가는 불가능하였다.

현재까지 transglycosylation 실험에서 단당 혹은 oligo당으로부터 각종 glycoside를 효소합성한 예는 몇 가지 알려져 있으나 starch로부터 직접 이 물질을 합성한 연구에는 아직 찾아 볼 수 없다.

반응산물의 정제 및 구조의 확인

α -Amylase에 의해 starch와 benzylalcohol로부터 합성된 glycoside의 구조 및 물성을 조사하기 위해 전술한 방법대로 물질을 정제하였다. 정제한 두 물질을 그 순도를 HPLC로 확인하고(Fig. 1A and Fig. 2A), ESI-Mass로 분자량을 측정하였다(Fig. 1B and Fig. 2B). Fig. 1의 Product 1은 $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ 의 값이 각각 m/z 268.5, m/z 304.7로 나타나 분자량이 270인 것으로 확인되었으며, Fig. 2의 product 2는 $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ 의 값이 각각 m/z 430.7, m/z 466.8로 나타나 분자량이 432.4인 것으로 판명되었다. 따라서 product 1은 한 분자의 glucose에 benzylalcohol 한 분자가 glycosidic bond로 결합한 benzylalcohol-glucoside(BG)이며, product 2는 maltose에 benzylalcohol 한 분자가 결합한 benzylalcohol-maltoside임을 확인할 수 있었다. 그러나 glucose의 어느 hydroxyl기에 benzylalcohol이 결합해 있는지 알 수 없기 때문에 정제물질의 환원력을 측정하였다. 그 결과 합성된 glycoside는 환원력을 갖지 않는 것으로 보아 glucose의 1번 위치에 알코올이 결합해 있는 것으로 추정되었다.

한편 합성된 화합물이 BG와 BM임을 다시 확인하기 위해 정제물질 각 10 mg을 α -glucosidase와 α -amylase로 수계에서 가수분해하였다. Fig. 3A에 나타난 결과와 같이 product 1은 25°C, pH 7.0에서 α -glucosidase에 의해 glucose와 benzylalcohol로 완전히 정량적으로 분해되는 양상을 보여 본 물질이 BG임이 확인되었으며 동시에 anomeric configuration도 α type임을 알 수 있었다. 또한 BM은 40°C, pH 5.0에서 α -amylase에 의해 신속하게 가수분해되어 glucose와 BG를 생성하였다(Fig. 3B). 이 결과는 Fig. 4의 당전이반응의 time course와도 일치하는 것으로 초기에 생성된 BM이 α -amylase에 의해 가수분해된다는 사실을 입증해 주고 있다. 따라서 이상과 같은 결과를 종합해 볼 때 최종적으로 α -amylase에 의해 합성된 glycoside는 glucose의 1번 OH기에 benzylalcohol 한 분자가 α 형태로 결합된 benzylalcohol- α -glucoside(BG)임을 알 수 있으며 그것도 반응초기에 생성된 BM의 가수분해에 의해 주로 생성되는 것으로 판단되었다.

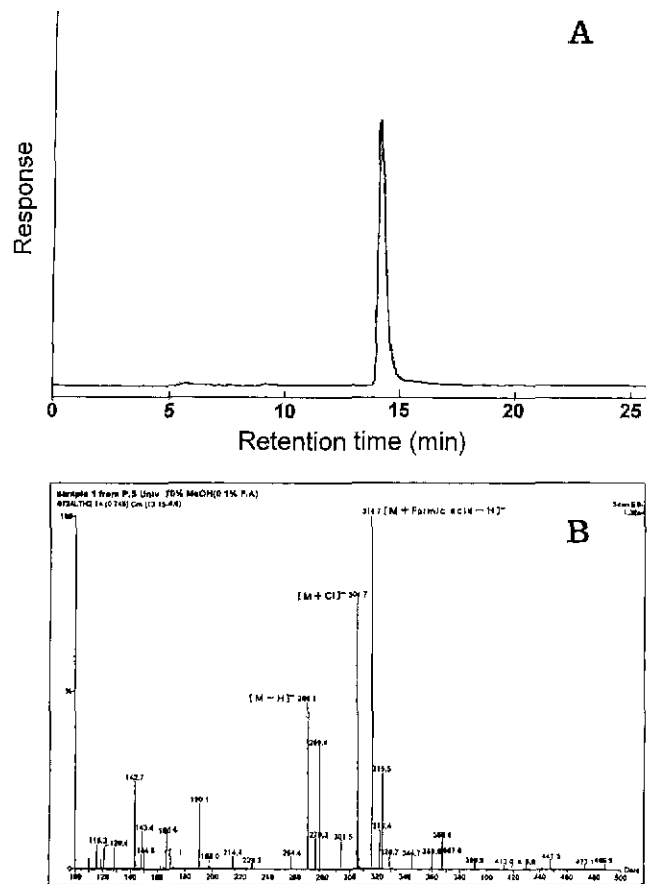


Fig. 1. HPLC chromatogram (A) and ESI-Mass spectrum (B) of purified benzylalcohol- α -glycoside (product 1).

종래 효소에 의한 배당체의 합성에는(27, 28) 몇몇 알려진 것이 있으나 이상계에서 직접 전분을 기질로 하여 glycoside를 합성한 예는 본 연구가 처음이며, 이는 효소의 새로운 특성을 이용한 연구결과라고 할 수 있다. 즉 이는 다당 가수분해 효소를 이용하여, 이용성이 낮은 기질에서 보다 유용성이 높은 새로운 화합물을 합성한다는 면에 있어서 의의가 있을 것으로 판단되며, 앞으로 어떤 종류의 기질에 단당을 glycosylation시키느냐에 따라서 유용성, 응용성이 뛰어난 고가의 물질 합성도 가능하리라고 본다.

반응시간에 따른 당전이반응

1%의 starch, 90%의 benzylalcohol, 10%의 citrate buffer (0.1 M, pH 5.0), 10 unit의 α -amylase를 함유하는 반응계에서 transglycosylation에 의한 glycoside의 생성량을 경시적으로 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 이 경우 반응초기에 BG와 BM이 동시에 생성되다가 반응이 경과함에 따라 BG의 양이 증가함을 알 수 있다. 즉 반응초기에 빠른속도로 BM이 생성되다가 시간이 경과함에 따라 생성된 BM이 다시 α -amylase에 의해 가수분해되어 glucose와 BG로 되는 것을 알 수 있다. 실험 초기에는 전술한 Table 1에서와 같이 BG만이 검출되어 본 효소의 반응산물이 BG 뿐인 것으로 판단하였으나, BM이 반응초기에 다량으로 생산되다가 반응시

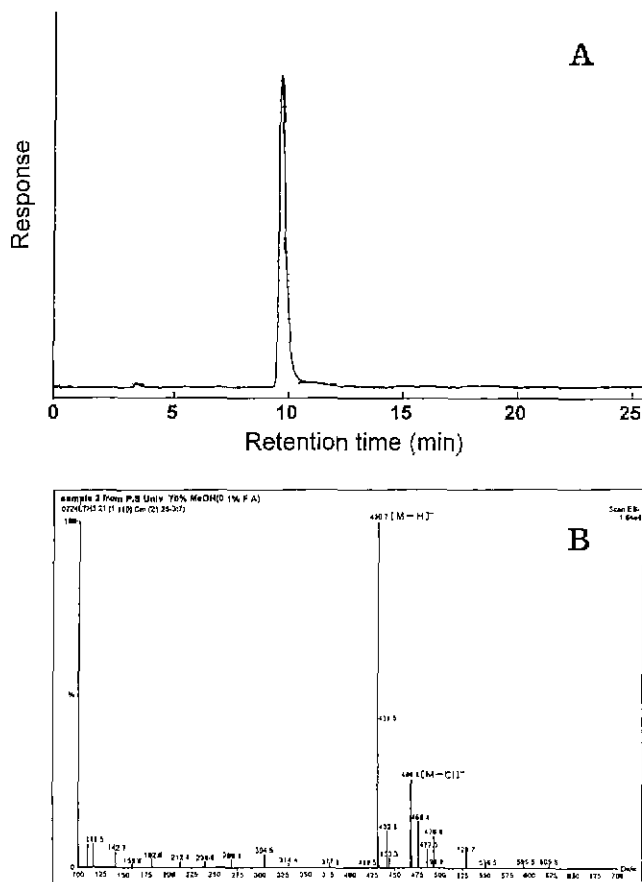


Fig. 2. HPLC chromatogram (A) and ESI-Mass spectrum (B) of purified benzylalcohol- α -maltoside (product 2).

간의 경과와 더불어 이 물질이 차츰 소실되는 특이한 반응 양상을 나타내었다. 한편 반응초기에는 BG, BM 이외에도 여러 종류의 배당체가 합성될 것으로 기대하여 HPLC로 이들을 확인하였으나 소량의 benzylalcohol-maltotrioside 이외에는 검출이 불가능하였다. 그러나 α -amylase의 효소특성상 여러 종류의 benzylalcohol-oligosaccharide가 합성될 가능성은 아직 배제할 수가 없으며 앞으로 각종 oligo당을 기질로 하여 α -amylase의 당전이반응에 대해 검토하게 된다면 효소의 반응특성을 확인할 수 있을 것으로 판단된다. 한편 이때 반응산물로는 BG, BM 이외에 glucose와 maltose도 동시에 생성되며 반응시간의 경과후에도 그 양은 변화하지 않았다. 반응계에 glucose와 maltose가 상당량 존재함에도 glycoside의 수율이 그 이상 증가하지 않는 것은 본 효소가 유리 glucose 또는 maltose에는 benzylalcohol을 glycosylation시킬 수 없다는 것을 뜻하며 동시에 합성된 glycoside도 이 효소에 의해 재차 가수분해되지 않는다는 것을 의미한다. 물론 합성과 분해가 동시에 일어나 평형상태가 유지될 수 있다고도 볼 수 있으나, 다음의 확인 결과 그와 같은 반응은 일어나지 않는 것으로 판단되었다. 즉 유리 glucose와 maltose에는 전혀 glycosylation 반응이 일어나지 않는 것으로 확인되어 상기 결론을 뒷받침하였다. 따라서 BG의 합성은 starch의 가수분해와 더불어 benzylalcohol에 glucose의 transglycosy-

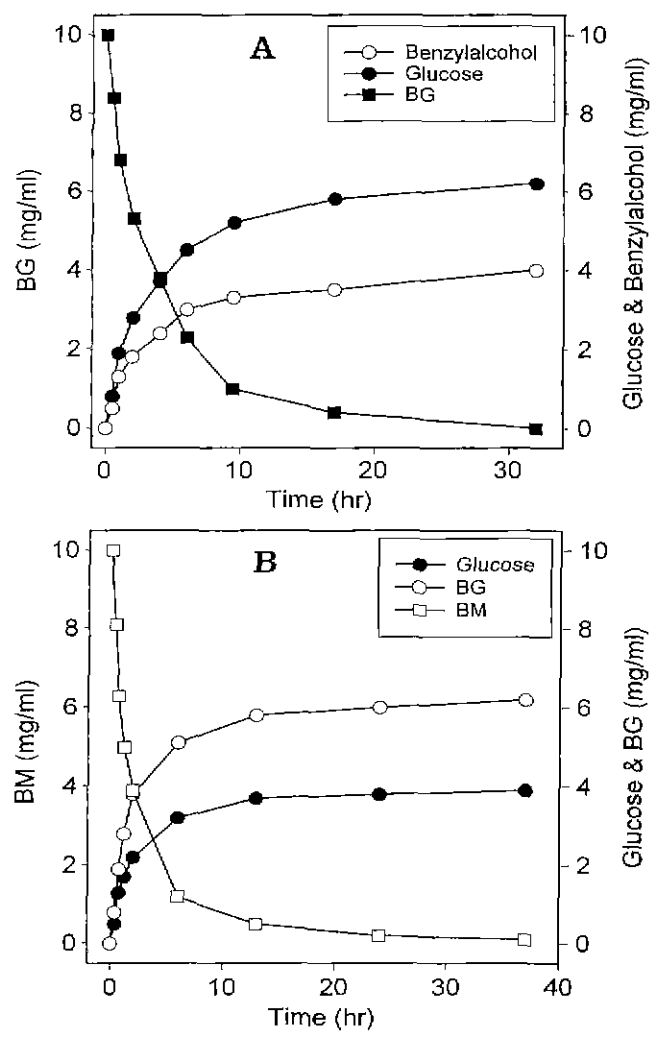


Fig. 3. Hydrolysis of benzylalcohol- α -glycoside (A) and benzylalcohol- α -maltoside (B) by α -glucosidase and α -amylase. The reaction mixtures containing 10 mg glycosides and 5 unit enzymes were incubated in 1 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and citrate buffer (0.1 M, pH 5.0), respectively. The hydrolysis rate of glycosides at 25°C and 40°C was measured to time intervals as indicated. BG: benzylalcohol- α -glycoside. BM: benzylalcohol- α -maltoside.

lation 반응이 동시에 일어나는 것으로 생각할 수 있다. Schellenbarger(18) 및 Sulistyo(23) 등에 의하면 invertase와 xylosidase로 sucrose와 xylooligosaccharide를 알콜류에 transglycosylation시켰을 때 합성된 glycoside가 반응시간의 경과에 따라 다시 가수분해되는 양상을 보인다고 보고하고 있으나, 본 실험에서 합성된 glycoside는 α -amylase에 의해서는 전혀 가수분해되지 않았다. 일반적으로 가수분해효소는 수계에서는 가수분해 반응을, 유기용매계에서는 가수분해의 역반응(합성)을 촉매한다고 알려져 있어 유기용매계에서 합성된 glycoside도 수계에서는 동일효소에 의해 다시 가수분해가 되는 것이 알려져 있으나 본 실험에서 합성된 BG는 수계에서도 가수분해되지 않는 것으로 나타났다. 이 결과는 본 실험의 반응계가 완전한 유기용매계가 아닌 이상

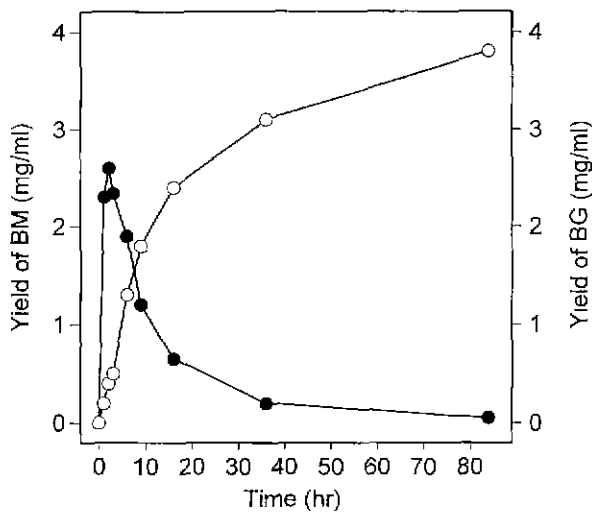


Fig. 4. The enzymatic synthesis of benzylalcohol- α -glycoside (BG) and benzylalcohol- α -maltoside (BM) by the transglycosylation of α -amylase from soluble starch in water-organic two phase system. The reaction mixture containing 1% starch, 90% benzylalcohol, 10% citrate buffer solution (0.1 M, pH 5.0), and 10 unit enzyme was incubated at 40°C with shaking. The products synthesized were measured to time intervals as indicated by HPLC. -○-: BG. -●-: BM.

계이기 때문인지는 알 수 없다.

감사의 말

이 연구는 한국과학재단(과제번호 971-1108-054-2) 및 1997년도 교육부 학술연구조성비(BSRI-97-4410)의 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Boland, W., C. Frobl, and M. Lorenz. 1991. Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. *Synthesis* 1094-1099.
- Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747-750.
- Chinsky, N., A.L. Margolin, and A.M. Klibanov. 1989. Chemoselective enzymatic monoacylation of bifunctional compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 386-388.
- Drueckhammer, D.G., W.J. Hennen, R.L. Pederson, C.F. Barbas, C.M. Gautheron, T. Krach, and C.H. Wong. 1991. Enzyme catalysis in synthetic carbohydrate chemistry. *Synthesis* 499-526.
- Galzy, P., Y. Gueguen, P. Chemardin, and P. Pommaris. 1995. Enzymatic synthesis of dodecyl β -D-glucopyranoside catalyzed by *Candida molischiana* 35M5N β -glucosidase. *Bioresource Technol.* 53, 26370-26375.
- Gabin V. and D. Thomas. 1992. Enzyme-catalyzed synthesis of alkyl β -D-glucoside in organic media. *Tetrahedron Lett.* 33, 4567-4570.
- Holla, E.W. 1989. Enzymatic synthesis of selectively protected glycals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28, 220-221.
- Jones J.D., A.J. Hacking, and P.S.J. Cheetham. 1992. Biological method for protection of 6-position of sucrose in synthesis of disaccharide high-intensity sweetener. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 203-210.
- Jones, J.B. 1986. Enzymes in organic synthesis. *Tetrahedron.* 42, 3351-3403.
- Kinoshita, M., S. Sakuda, and Y. Yamada. 1993. Preparation of N-monoalkyl and O-acyl derivative of allosamidin and their chitinase inhibitory activity. *Biosci. Biochem. Bioeng.* 57, 1699-1703.
- Kirchner, G., M.P. Scollar, and A.M. Klibanov. 1985. Resolution of racemic mixture via lipase catalysis in organic solvent. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7272-7276.
- Klibanov, A.M. 1986. Enzyme that work in organic solvent. *Chemtech.* 16, 354-359.
- Nakano, H., S. Takenishi, and Y. Watanabe. 1988. Formation of transfer products from soybean arabinogalactan and glycerol by galactanase from *Penicillium citrinum*. *Agric. Biol. Chem.* 52, 1913-1921.
- Nilson, K.G.I. 1988. Enzymatic synthesis of oligosaccharides *Trends Biotechnol.* 6, 256-263.
- Otera, J. 1993. Transesterification. *Chem. Res.* 93, 1449-1454.
- Oyama, K., S. Nishimura, Y. Nonoka and T. Hashimoto. 1981. Synthesis of an aspartame precursor by immobilized thermolysis in an organic solvent. *J. Org. Chem.* 46, 5241-5245.
- Schlotterbeck, A., S. Lang, V. Wray, and F. Wagner. 1993. Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnol. Lett.* 15, 61-64.
- Schellenbarger, A. 1990. Invertase-catalyzed reaction in alcoholic solutions. *Biotech. Bioeng.* 35, 1006-1012.
- Sin, Y.M., S.H. Chung, J.Y. Park, and T.H. Lee. 1996. Synthesis of biodegradable emulsifier using lipase in anhydrous pyridine. *Biotechnol. Lett.* 18, 689-694.
- Sin, Y.M., S.O. Lee, J.D. Lee, and T.H. Lee. 1997. Synthesis of fructose ester compound by lipase in organic solvent. *Kor. J. Microbiol.* 33, 181-186.
- Sin, Y.M., S.H. Chung, S.O. Lee, H.K. Shin, and T.H. Lee. 1997. Synthesis of bioemulsifier by transesterification reaction of lipase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 420-426.
- Sin, Y.M., K.W. Cho, and T.H. Lee. 1998. Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine *Biotechnol. Lett.* 20, 91-94.
- Sulistyo, J., Y. Kamiyama, H. Ito, and T. Yasui. 1994. Enzymatic synthesis of hydroquinone β -xyloside from xylooligosaccharides *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1311-1313.
- Therisod, M. and A.M. Klibanov. 1986. Facile enzymatic preparation of monoacylated sugar 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 lipase in organic solvent. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 3977-3982.
- Trincone A., B. Nicolaus, L. Lama, and A. Gambacorta. 1991. Stereochemical studies of enzymatic transglycosylation using *Sulfolobus solfataricus*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2841-2844.

27. Valerie L. and M.R. Willemot. 1992. Glucoside synthesis by glucoamylase or β -glucosidase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* **14**, 169-174
28. Vulfson, E.N., R. Patel, and B.A. Law. 1990. Alkyl- β -glucoside synthesis in water-organic two phase system. *Biotechnol. Lett.* **12**, 397-402.
29. Wang, L.X., C. Li, Q.W. Wang, and Y.Z. Hui. 1993. Total synthesis of the sulfated lipooligosaccharide signal involved in *Rhizobium meliloti-alfalfa* symbiosis. *Tetrahedron Lett.* **34**, 7763-7766.
30. Wong, C.H., M. Schuster, P. Wang, and P. Sears. 1993. Enzymatic synthesis of N- and O-linked glycopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5893-5901.

(Received October 22, 1998/Accepted December 26, 1998)

ABSTRACT: Synthesis of Glycosides by Transglycosylation of α -Amylase from Soluble Starch in Water-Organic Two Phase System

Jong Yi Park, Jae Dong Lee, Kyung Lib Jang, and Tae Ho Lee* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Benzylalcohol- α -glucoside (BG) was synthesized from soluble starch by transglycosylation of α -amylase. Transglycosylation in water-organic two phase system containing 1% soluble starch as a glycosyl donor, 90% benzylalcohol as a glycosyl acceptor, 10% citrate buffer solution (0.1 M, pH 5.0), and 10 unit of α -amylase (*Aspergillus oryzae*) was showed highest efficiency. About 4 mg BG was obtained from 10 mg starch in reaction for 80 hrs at 40°C. Initially benzylalcohol- α -maltoside (BM) was major product, but as the reaction proceeded, it was hydrolyzed to glucose and BG. Finally the product of transglycosylation by α -amylase was only BG. The both products did not show reducing power and hydrolyzed by α -glucosidase and α -amylase, respectively. The molecular weights of both were estimated to be 270 and 432 by ESI-Mass, respectively.