

## 효소반응에 의한 장쇄 알킬모노글리세리드의 선택적 합성에 있어 동력학적 고찰

김상춘 · 김홍수\* · 조경형\*\* · 남기대

충북대학교 공과대학 공업화학과  
\* 충청실업전문대학 화학공학과  
\*\* 한국표준연구소 선임연구원

### Kinetics for Selective Synthesis of Enzymatic Long Chain Alkyl Monoglycerid

Kim, S. C. · Kim, H. S\* · Joe, K. H\*\* · Nam, K. D.

Dept. of Ind. Chemisty Chungbuk Nat. University  
\* Department of Chemical Industry Choongchung  
\*\* Institution of Korea Standard Research  
(Received May. 20, 1993)

#### ABSTRACT

1,2-Isopropylidene glycerol produced by ketalization of glycerol with acetone was esterified with long chain fatty acids in the presence of a *Mucor miehei* lipase to obtain 1,2-isopropylidene 3-long chain acyl glycerol. To determine optimal conditions for the esterification reaction, esterification was proceeded as a reversible second-order reaction in various parameters that are enzyme/substrate ratio 0.096g/g at reaction temperatures ranged from 25°C to 70°C. The order of reaction rate of fatty acids were lauric acid, myristic acid, oleic acid, and stearic acid. The range of their activation energies were from 7.8 to 11.4 (kcal/mol) and that of entropies of activation which have negative values were from 42.8 to 52.5(e.u.).

#### I. 서 론

글리세린과 고급지방산의 에스테르화는 glycerolysis 및 hydrolysis<sup>1~4)</sup>에 의한 산·알카리 촉매반응이 전형적이다. 요즈음 이들 반응에 있어서 촉매로 효소를 이용하는 것은 무공해 공정개선과 고부가가치성 향상의 일환으로 매우 다양화되어 있으며 고급지방산의 polyol류(당류) 에스테르 생산에 있어 보다 많은 다양한 방법으로 연구되고 있다.<sup>5~8)</sup> 일반적으로 온화한 반응조건을 갖는 효소적 합성방법은 높은 촉매효율, 생체 촉매의 고유선택성<sup>9)</sup>으로 인하여

보다 순수한 생성물을 얻을 수 있다. 리파제는 hydrolases의 효소학적 부류에 속하고 가수분해 및 에스테르 형성에 대한 전형적인 효소의 일종이다.

글리세린 내에서 고급지방산의 활성화에 의존하는 리파제는 비특이성이나 1,3-특이성으로 분류된다. 또한 일반적으로 효소의 고정화는 열에 대한 안정성을 증가시킨다. 효소 분자에 있어 반응물의 확산은 고정화 효소의 활성화에 영향을 미치고, 반응온도가 높아짐에 따라 활성이 용이하지만 높은 온도는 효소를 변형시킬 가능성이 있기 때문에 이를 피하지 않으면 안된다.<sup>10)</sup>

고정화시키지 않은 리파제를 사용할 때 효소반응

은 리파제가 밀집되는 물과 지질사이의 계면인 에멀전계에서 일어난다. 고정화된 리파제의 반응은 고정된 담체 표면과 물-지질 계면에서 일어나기 때문에 비유화계에서 진행할 수 있다. 고정화 담체는 macroporous 음이온 교환 수지를 이용하여 적절한 활성 형태를 유지하기 위한 기본적인 물을 보유할 수 있으며, 반응하는 동안 형성된 물은 반응계로 부터 제거하여야 한다. 고정화 효소를 촉매로 사용할 경우에 반응계로 소량의 물을 가함으로써 반응 수율을 높일 수 있다.<sup>11-12)</sup>

본 연구는 먼저 glycerol을 1,2-isopropylidene glycerol로 케탈화한<sup>13)</sup> 후에 3-long chain acyl glycerol을 합성하였다. 또한 이를 산처리함으로써 식품, 의약품 및 그외의 공업적응용<sup>14)</sup>에 있어 유화제로 사용되는 1-mono acyl glycerol을 효과적으로 얻을 수 있었다.

효소촉매는 1,3-특이성 고정화 리파제인 *Mucor miehei* lipase(Lipozyme)를 사용하였고, 특히 이는 고정화 담체(macroporous anion exchange resin)를 선택하였기 때문에 용매를 필요로 하지 않는다. 또한 용매자유계<sup>15)</sup>에서 포화 고급지방산인 lauric acid, myristic acid, stearic acid 및 불포화 고급지방산인 oleic acid와 1,2-isopropylidene glycerol을 반응온도 25~70°C 범위내에서 에스테르화 반응시키고 그 변수를 실험하였다. 그리고 속도론적 변수 및 활성화 파라미터를 비교 검토하였다.

## II. 실험 방법

1,2-Isopropylidene glycerol은 Knez의 합성법<sup>16)</sup>을 적용하여 glycerol과 아세톤을 산촉매 축합반응으로 합성하여 시료로 사용하였고, 이것과 잘 정제된 고급 지방산류인 lauric acid, myristic acid, stearic acid 및 oleic acid를 효소촉매하에서 탈수반응 시켰다. 반응에서 생성되는 물을 제거하기 위하여 감압 펌프를 연결시킨 100ml용 둥근바닥 플라스크를 개량하여 사용하였고, 에스테르를 형성하는 방향으로 평형을 이동시켰다. 이 때 리파제의 일정량을 1,2-isopropylidene glycerol과 고급지방산 등물 혼합물에 가하고 일정한 압력하에서 반응온도는 25°C, 40°C, 55°C 및 70°C의 온도에서 실험하였다.

800분 후에 물과 디에틸에테르를 가하여 효소를 여과하였다. 이때 수용액상은 에테르로 추출하며 유기층을 합하고 0.5M NaOH로 2~3회 세척하였다.

1,2-Isopropylidene glycerol의 정량 분석은 gas chromatography로 하였고 mass spectrometry로 확인하였다. 즉 Hewlett Packard 5890A의 gas chromatography를 Hewlett Packard 5985 mass spectrometer와 연결하였으며, 이때 조건은 다음과 같다.

Column : SPB-5 fused silica capillary(30m×0.32mm i.d.)

Program : 40~250°C at 10°C/min

Injection temperature : 190°C

Transfer line temperature : 250°C

Mass spectra : 41~250m/e

최적 반응조건을 결정하기 위하여 1 기압하에서 온도차이는 15°C로 하였다.

## III. 실험 결과 및 고찰

25~70°C 범위에서 시간에 따른 생성물의 양을 Fig. 1~4에 도시하였다. 일반적으로 온도가 증가할수록 에스테르화 반응은 점차 증가하는 경향을 보였다. 그러나 70°C에서는 반응시간이 3시간 이상 경과함으로써 오히려 감소하였고, 반응시간이 10시간 이상일 때에는 모두 평형을 유지하였다. 따라서 효소촉매 반응이 평형이동은 에스테르가 형성되는 방향으로 진행되며 25°C에서는 물의 낮은 증기압 때문에 55°C보다 높은 온도에서와 같이 효소활성이 떨어지며, 물이 적절하게 제거되지 않는다. 온도가 상승함에 따라 전반적으로 보다 높은 수율로 에스테르화가 진행됨을 알 수 있었고, 고급 지방산의 탄소수가 12~18로 증가함에 따라 수율이 감소하였는데 탄화수소의 탄소수가 같은 oleic acid와 stearic acid에서는 이중결합이 있는 oleic acid가 에스테르화 반응이 빠르게 일어났다. 또한 효소의 활성이 저하되는 속도는 온도가 상승함에 따라 증가하였고, 반응수율 및 에스테르화 전환율은 55~70°C를 비교할 때 70°C에서 낮은 평형 전환율을 보인다. 이와같이 높은 온도에서 낮은 전환율을 보이는 것은 일정 압력하에서 물

이 효율적으로 제거되어 효소 활성이 감소된다는 Pecnik의 연구결과<sup>16)</sup>와 잘 일치하였다.

효소촉매하에 평형전환율이 80%인 경우 에스테르화 반응온도에 따른 최적화 전환율은 Fig. 5에서와

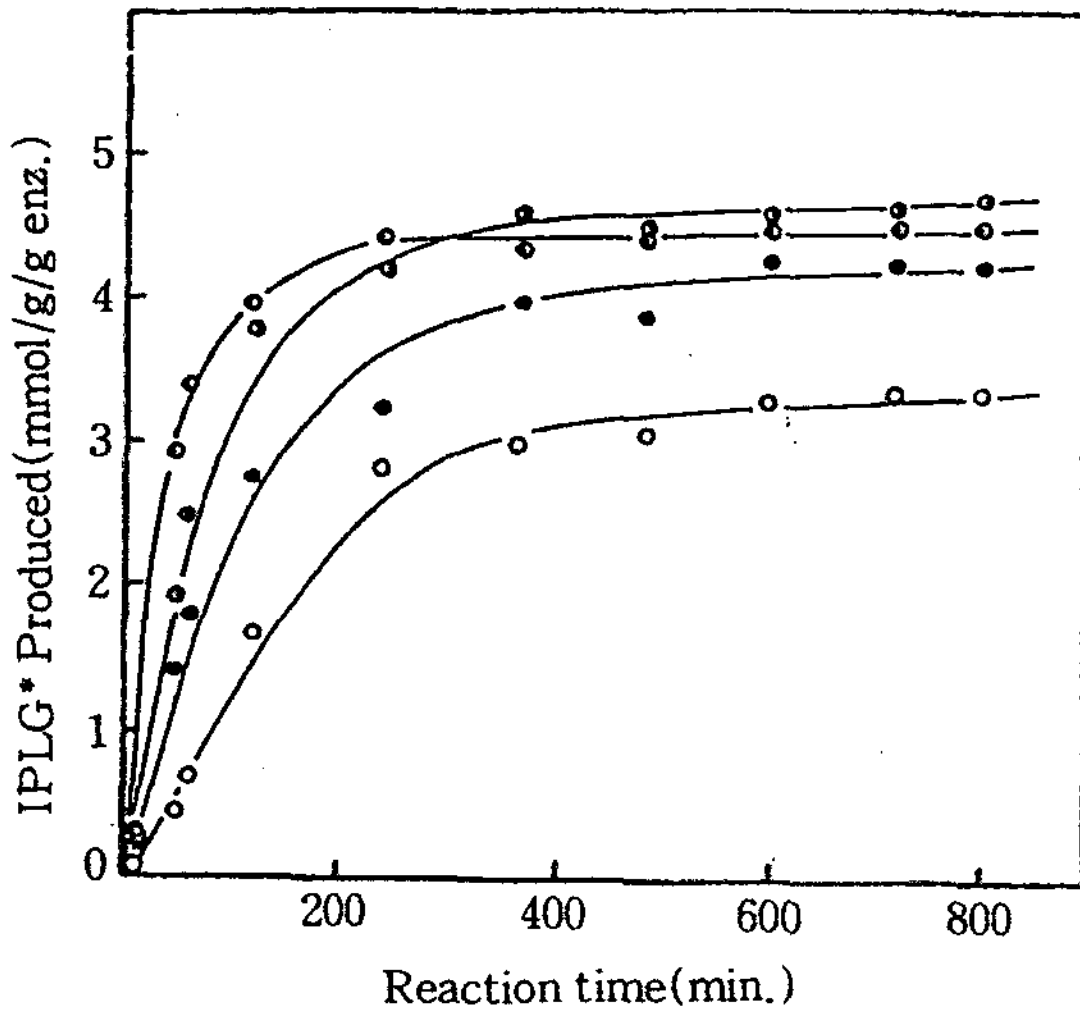


Fig. 1. Progress curves of esterification for 1,2-isopropylidene 3-lauroyl glyceride.

○ : 25°C ● : 40°C ◐ : 55°C ◑ : 70°C

\*IPLG : 1,2-isopropylidene 3-lauroyl glyceride

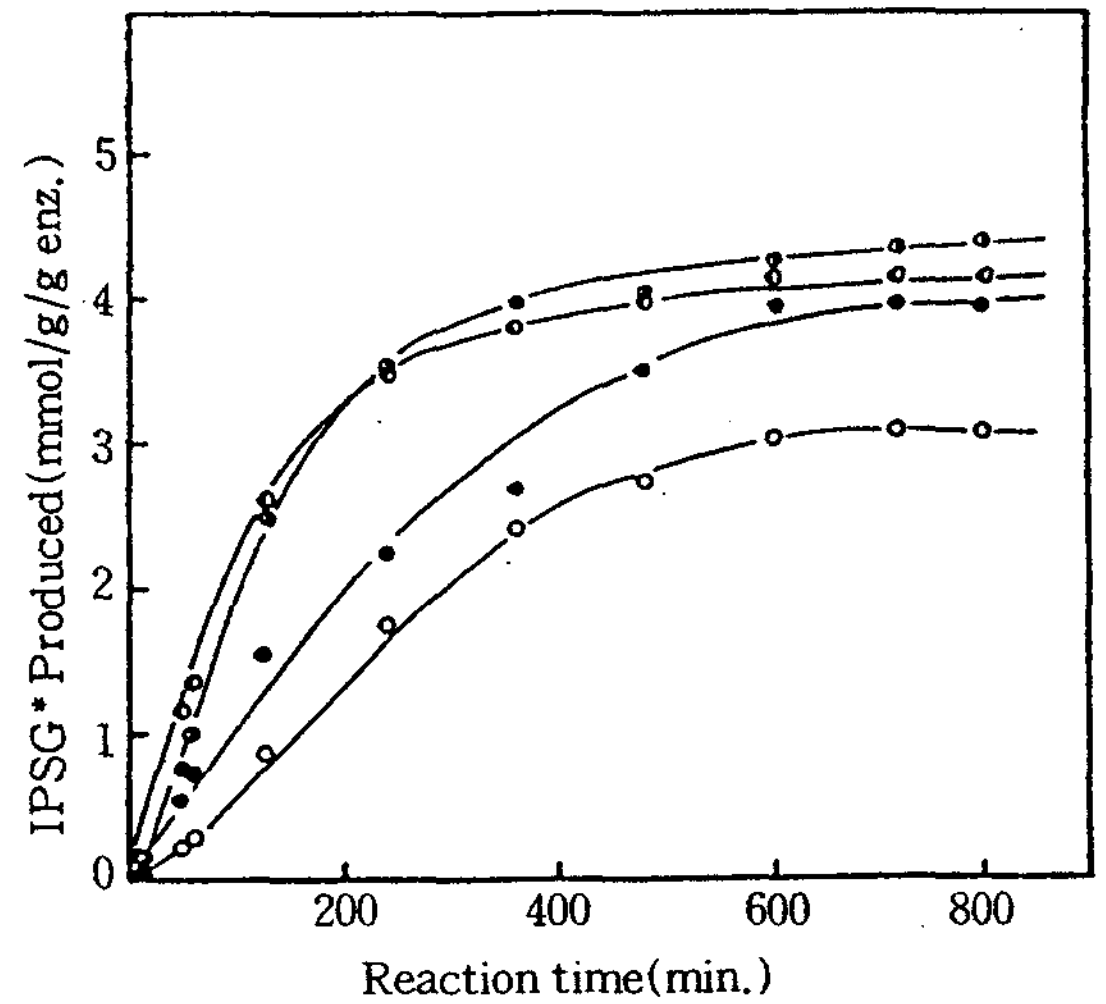


Fig. 3. Progress curves of esterification for 1,2-isopropylidene 3-stearoyl glyceride.

○ : 25°C ● : 40°C ◐ : 55°C ◑ : 70°C

\*IPSG : 1,2-isopropylidene 3-stearoyl glyceride

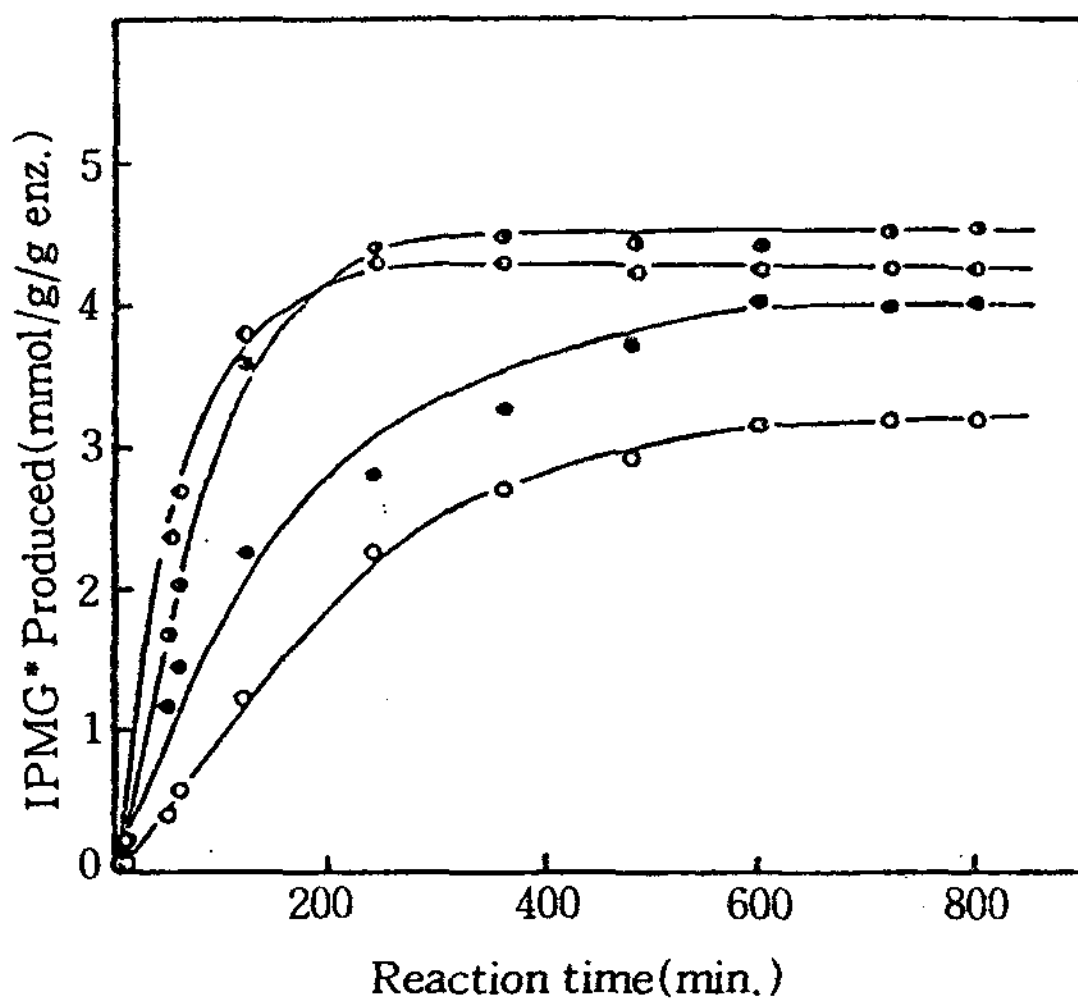


Fig. 2. Progress curves of esterification for 1,2-isopropylidene 3-myristoyl glyceride.

○ : 25°C ● : 40°C ◐ : 55°C ◑ : 70°C

\*IPMG : 1,2-isopropylidene 3-myristoyl glyceride

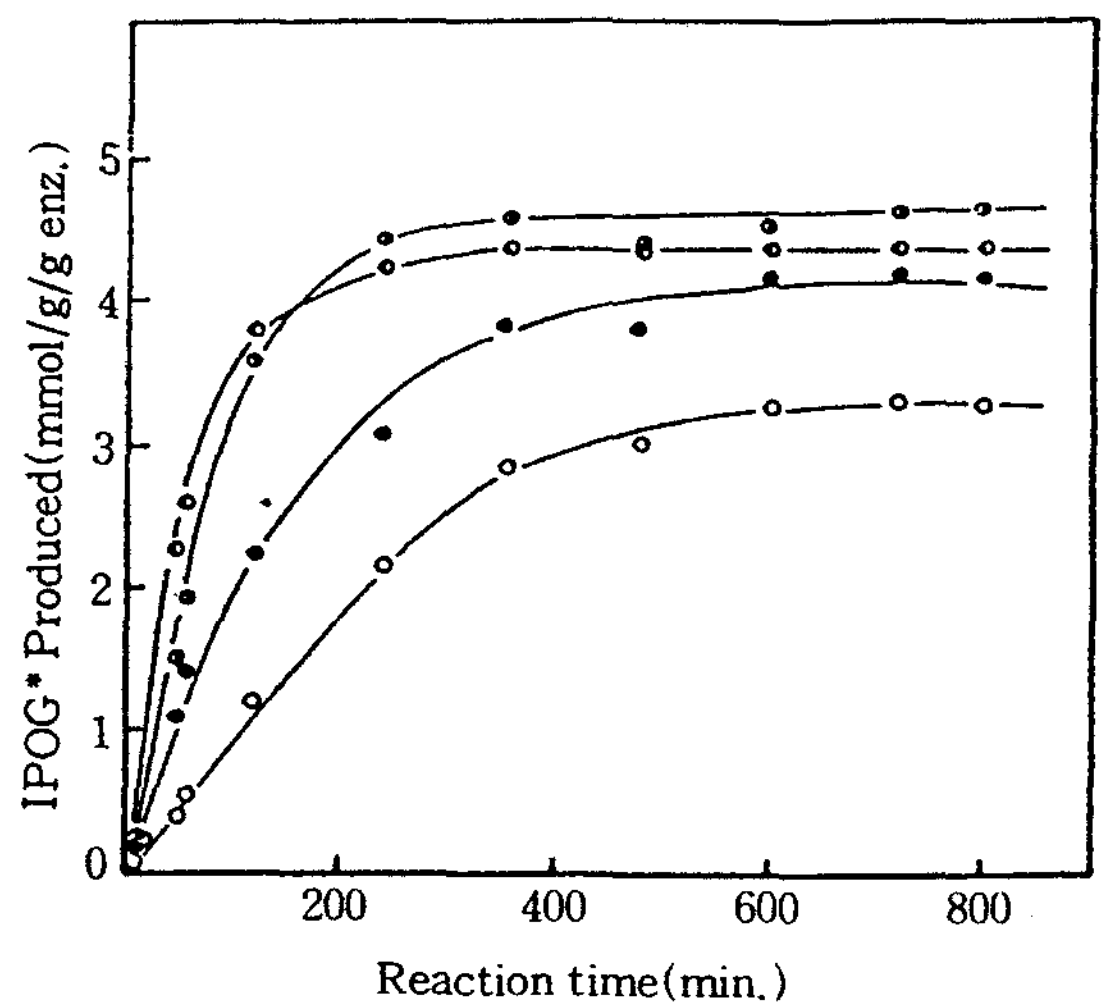


Fig. 4. Progress curves of esterification for 1,2-isopropylidene 3-oleoyl glyceride.

○ : 25°C ● : 40°C ◐ : 55°C ◑ : 70°C

\*IPOG : 1,2-isopropylidene 3-oleoyl glyceride

같이 효소촉매에 의한 고급 지방산류의 에스테르화 반응에 있어서 최적반응 온도조건은 50~60℃임을 알 수 있다. 일정한 압력에서 에스테르화되는 동안 생성된 물은 에스테르가 생성하는 방향으로 평형이 이동되는 계에서, 물이 제거되지 않아 대부분의 고급 지방산이 낮은 평형전환율을 나타낸다.

본 연구에서는 시행오차법에 의하여 동일한 초기 농도를 갖는 가역 2차 에스테르반응으로 고려되므로 고급지방산의 소모에 대한 일반적인 반응속도식<sup>17)</sup>을 다음과 같이 유도하였다.

$$-dC_a/dt = k_1 C_a^2 - k_2 C_c^2 \dots\dots\dots (1)$$

$C_a$  : concentration of long chain fatty acid (mol/l)

$C_c$  : concentration of 1, 2-isopropylidene 3-acyl glycerol (mol/l)

장쇄 지방산의 농도대신 장쇄 지방산의 전환율 ( $X_a$ )로 대치하여 균일한 미분방정식으로 (1)식을 적분하여 정리하면 다음과 같다.

$$\ln\left\{\frac{X_e - X_a(2X_e - 1)}{X_e - X_a}\right\} = 2k_1(1/X_e - 1)C_{a0}t \dots\dots\dots (2)$$

$X_a$  : conversion ratio of long chain fatty acid

$X_e$  : equilibrium conversion ratio of long chain fatty acid

$C_{a0}$  : initial long chain fatty acid concentration (mol/l)

$t$  : reaction time (sec)

$k_1$  : rate constant for esterification (l/mol · sec)

정상상태에서의 반응이 진행되는 것으로 가정하고 정반응의 속도상수  $k_1$ 과 역반응의 속도상수  $k_2$ 와의 관계는 다음과 같다.

$$k_2 = k_1(1 - X_e)k^2/X_e^2 \dots\dots\dots (3)$$

Fig. 6~9는 정반응의 속도상수  $k_1$ 을 구하기 위하여 반응속도식 (2)의 왼쪽항과 반응시간을 plot한 것이다. 이때 각각의 기울기로 부터 각 반응온도에서의  $k_1$ 과 (3)식에서  $k_2$ 값을 구하였고, 이로 부터 평형상수  $K$ 를 구하여 이 결과를 Table 1에 표시하였다. 또한 정상상태에서 다음과 같은 관계식<sup>17)</sup>에서 계산한

실험적 평형상수( $K_x$ ) 값을 Table 2에 표시하였다.

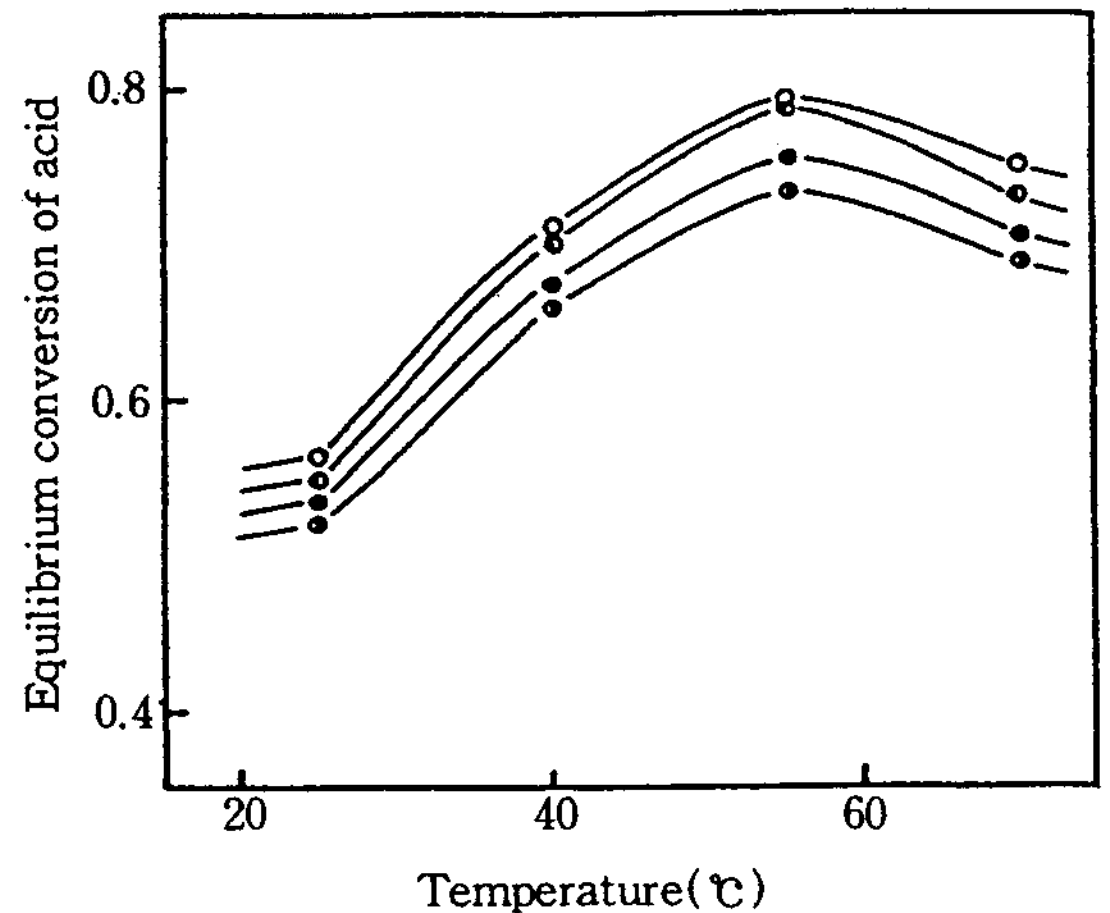


Fig. 5. Effect of temperature on equilibrium conversion of long chain fatty acid at different total pressure of reaction system.

○ : lauric acid, ● : myristic acid  
◐ : stearic acid, ● : oleic acid

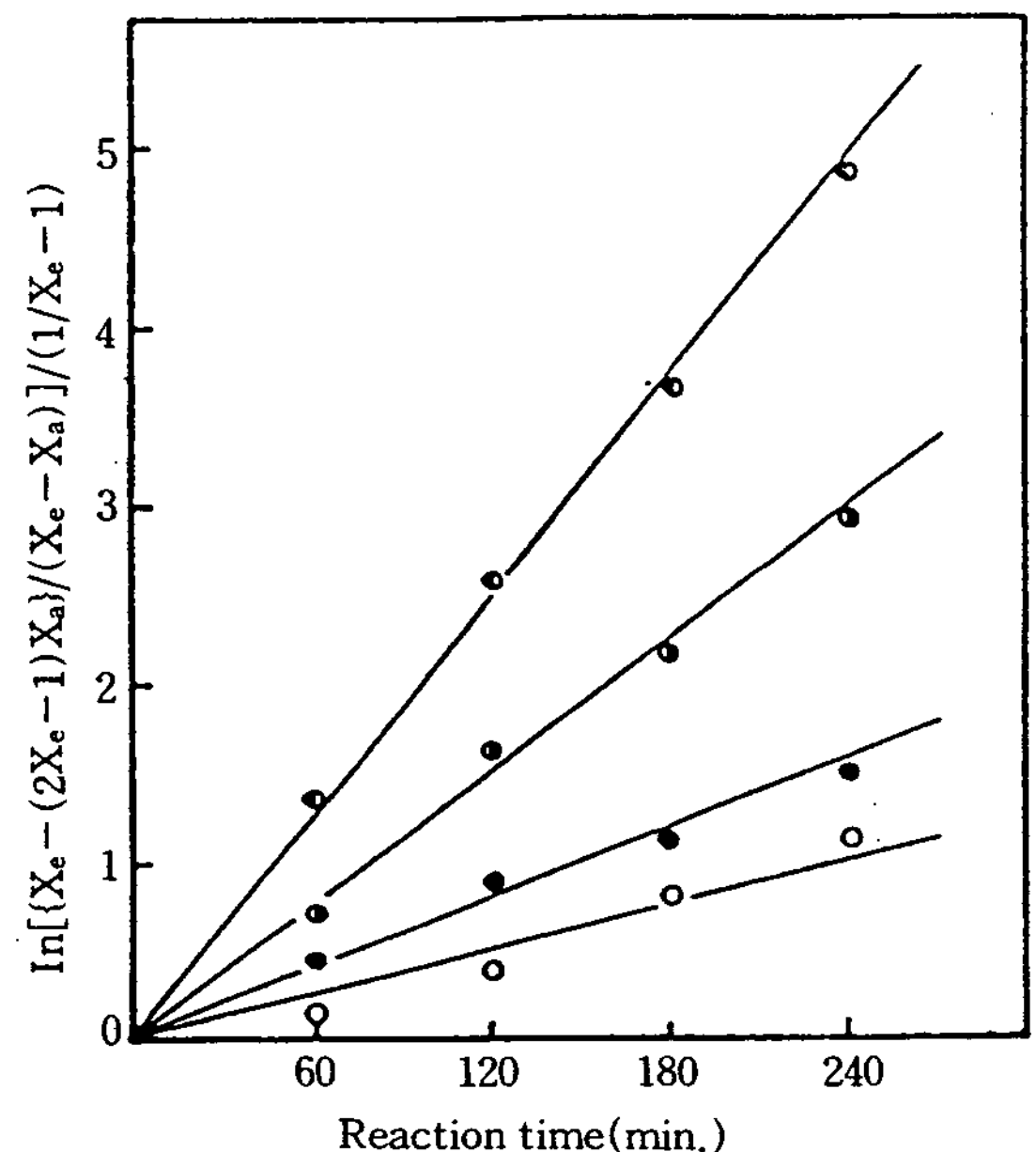


Fig. 6. Order of reaction and initial rate constants determination reversible second-order interpretation in the enzymatic reaction of lauric acid and isopropylidene glycerol.

○ : 25°C, ● : 40°C, ◐ : 55°C, ● : 70°C

$$K_x = K_{ce} X_{de} / X_{ae} X_{be} \dots\dots\dots (4)$$

$X_{ae}, X_{be}$  : mole fraction of reactants in equilibrium

$X_{ce}, X_{de}$  : mole fraction of products in equilibrium

Table 1, 2에서 보는 바와 같이  $K \approx K_s$  값이 잘 일

치함을 알 수 있다. 또한 이 결과 효소촉매의 에스테르 반응이 가역 2차반응으로 진행되며 각 고급 지방산의 탄소수가 증가함에 따라 반응속도는 작아진다. 그리고 탄소수가 동일한 stearic acid와 oleic acid에서는 2중결합이 존재하는 oleic acid의 반응속도가 빠르다.

Table 1. The rate constants and equilibrium constants of reversible esterification reaction

Comp'd.	$k_1 \times 10^4 (l/mol \cdot sec)$				$k_2 \times 10^5 (l/mol \cdot sec)$				k			
	25°C	40°C	55°C	70°C	25°C	40°C	55°C	70°C	25°C	40°C	55°C	70°C
IPLG	1.39	2.19	4.14	7.21	8.72	3.73	3.18	8.01	1.59	5.89	12.90	9.00
IPMG	0.81	1.69	3.61	6.53	5.99	3.99	3.80	11.4	1.35	4.24	9.50	5.73
IPSG	0.36	0.88	1.92	3.98	2.98	2.38	2.50	8.18	1.19	3.68	7.68	4.87
IPOG	0.78	1.56	2.16	5.56	5.21	2.86	2.43	7.38	1.49	5.45	13.00	7.53

$k_1$  : the forward rate constant for esterification  
 $k_2$  : the backward rate constant for esterification  
 $K$  : the equilibrium constant

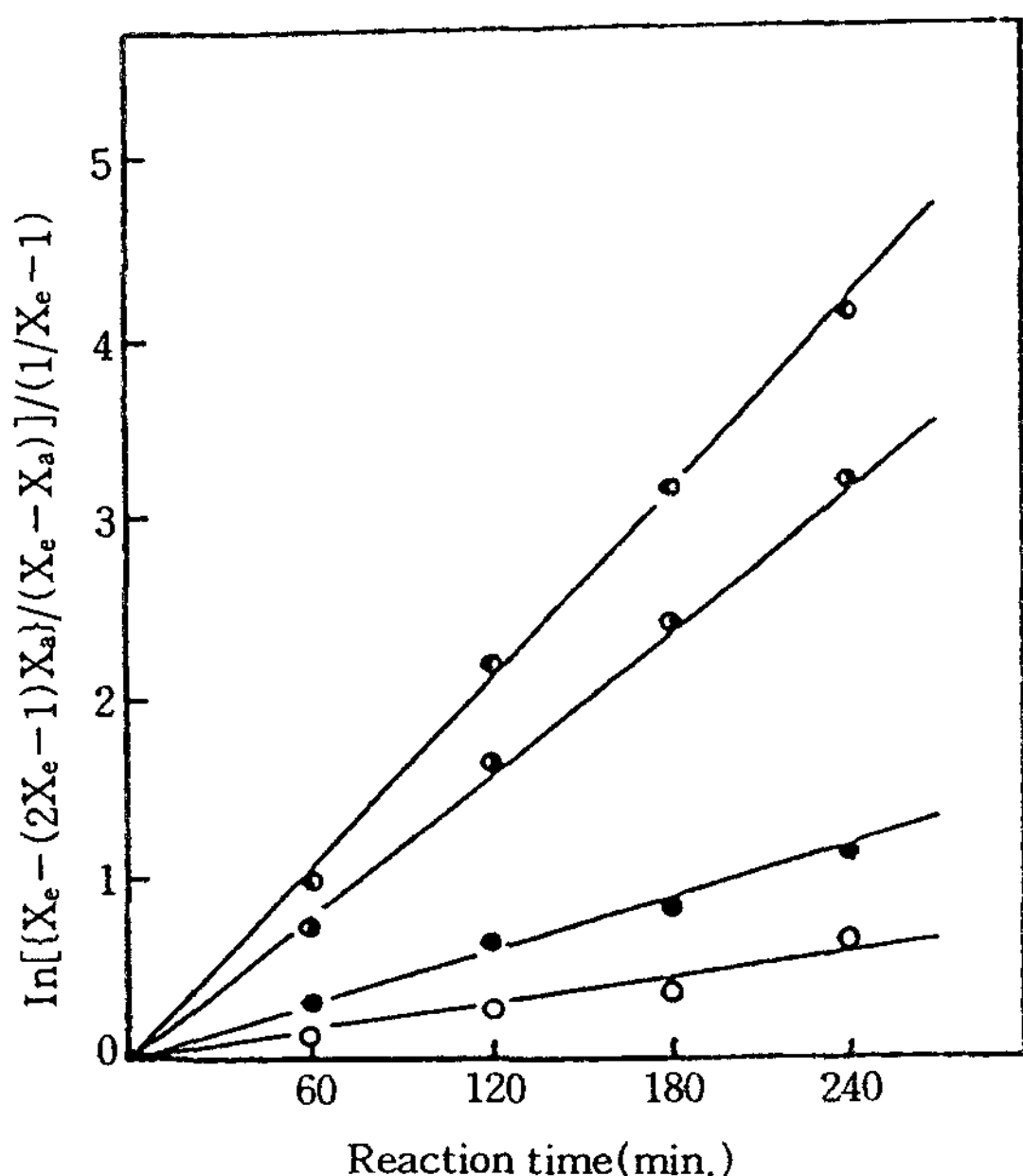


Fig. 7. Order of reaction and initial rate constants determination reversible second-order interpretation in the enzymatic reaction of myristic acid and isopropylidene glycerol.

○ : 25°C, ● : 40°C, ◐ : 55°C, ◑ : 70°C

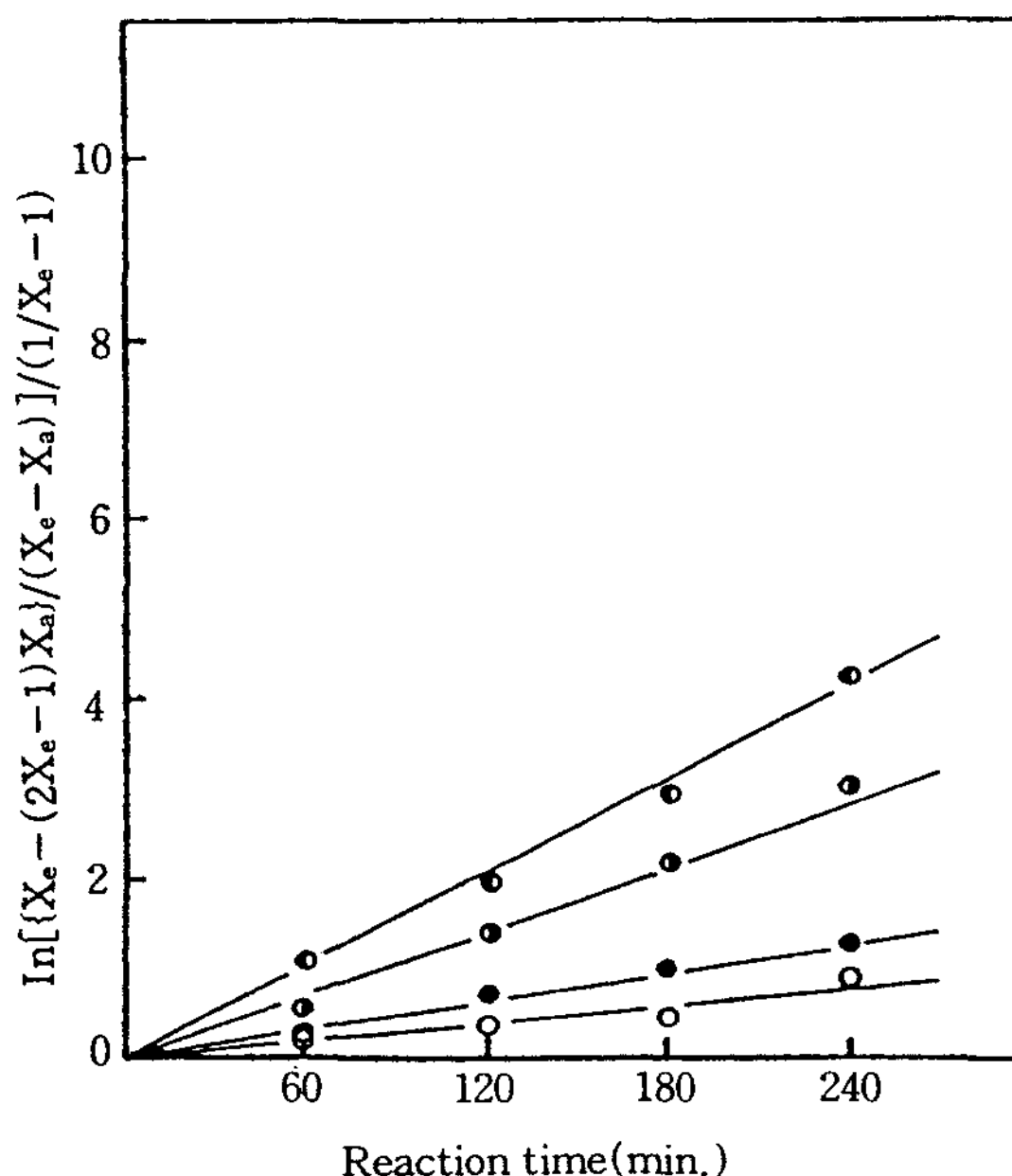


Fig. 8. Order of reaction and initial rate constants determination reversible second-order interpretation in the enzymatic reaction of stearic acid and isopropylidene glycerol.

○ : 25°C, ● : 40°C, ◐ : 55°C, ◑ : 70°C

Fig. 10은 효소촉매하에서의 에스테르화 반응에서 구한 각각의 정반응 속도 상수( $k_1$ )와 반응온도에 대한 Arrhenius plot로서 양호한 직선관계가 성립된다. 이 기울기로 부터 활성화 에너지를 구하고, 활성화 엔탈피( $\Delta H^\ddagger$ )를 계산하였으며 Eyring식에서 활성화 엔트로피( $\Delta S^\ddagger$ )를 계산하여 이 결과를 Table 3에 나타내었다. 활성화 파라미터를 나타낸 Table 3에서 효소촉매하에 고급지방산과의 에스테르화반응은 고급지방산의 탄소수가 증가함에 따라 활성화 에너지, 활성화 엔탈피, 활성화엔트로피의 값이 모두 증가하였다. 한편 탄소수가 동일한 고급지방산인 stearic acid와 oleic acid에서는 2중결합이 존재하는 oleic acid의 활성화 에너지가 작았다. 또한 활성화 엔트로피 값이 모두 음의 값을 갖는데 이는 2분자 반응에서 전이상태의 부피가 감소함에 따라 엔트로피 손실이 일어나기 때문이다. 그리고 전이상태에서 전장이 증가되어 정전수축이 크게되어 엔트로피가 감소하는 것으로도 예상할 수 있다. 따라서 극성을 띠

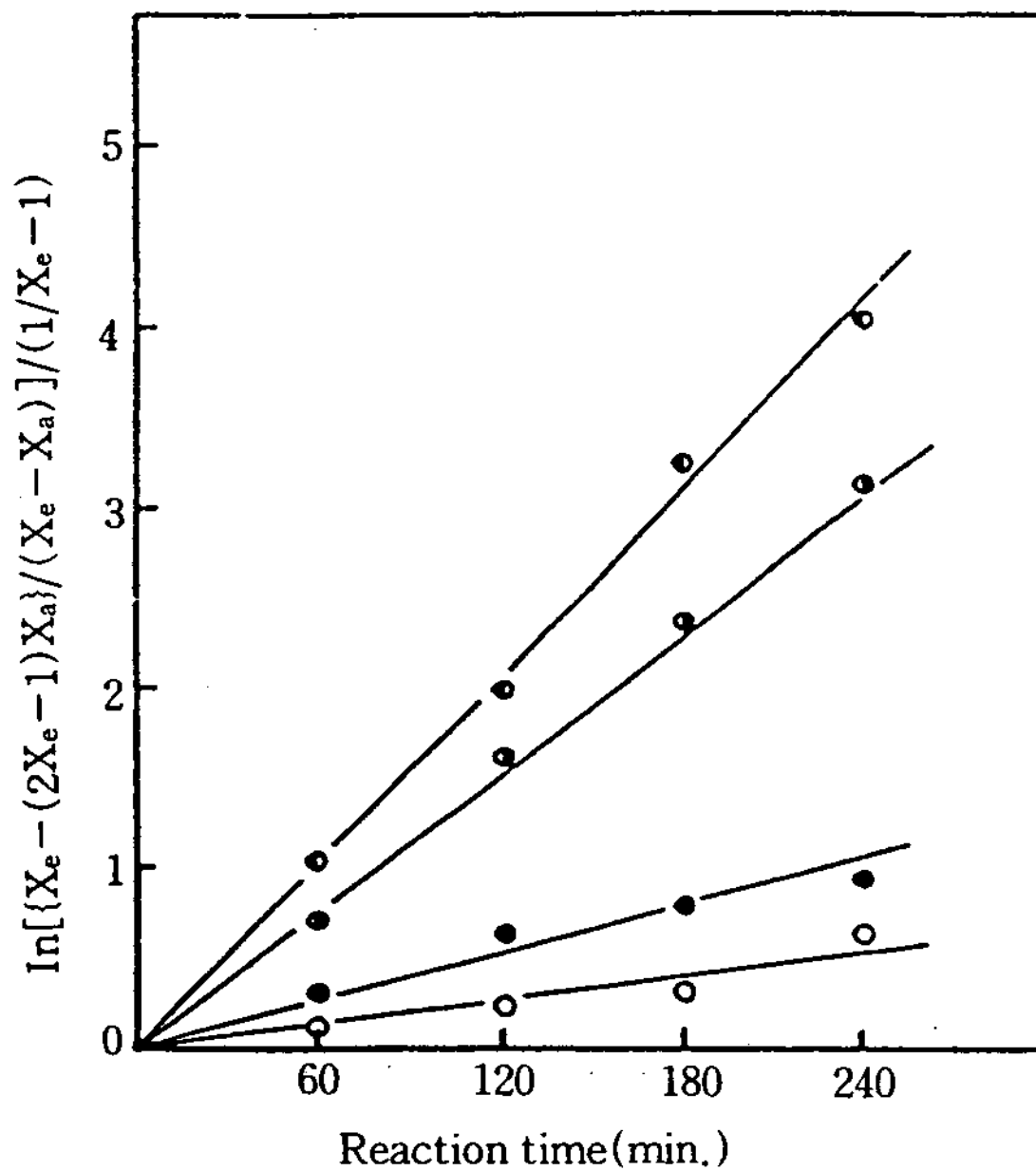


Fig. 9. Order of reaction and initial rate constants determination reversible second-order interpretation in the enzymatic reaction of oleic acid and isopropylidene glycerol.

○ : 25°C, ● : 40°C, ◐ : 55°C, ◑ : 70°C

Table 2. The experimental equilibrium constants of reversible esterification reaction

Comp'd	IPLG	IPMG	IPSG	IPOG	
25°C	X <sub>ae</sub>	0.221	0.232	0.239	0.225
	X <sub>be</sub>	0.221	0.232	0.239	0.225
	X <sub>ce</sub>	0.279	0.268	0.261	0.275
	X <sub>de</sub>	0.279	0.268	0.261	0.275
	K <sub>x</sub>	1.59	1.33	1.19	1.47
40°C	X <sub>ae</sub>	0.146	0.163	0.172	0.150
	X <sub>be</sub>	0.146	0.163	0.172	0.150
	X <sub>ce</sub>	0.354	0.337	0.328	0.350
	X <sub>de</sub>	0.354	0.337	0.328	0.350
	K <sub>x</sub>	5.88	4.27	3.64	5.44
55°C	X <sub>ae</sub>	0.108	0.123	0.133	0.108
	X <sub>be</sub>	0.108	0.123	0.133	0.108
	X <sub>ce</sub>	0.392	0.377	0.367	0.392
	X <sub>de</sub>	0.392	0.377	0.367	0.392
	K <sub>x</sub>	13.20	9.39	7.61	13.20
70°C	X <sub>ae</sub>	0.125	0.147	0.156	0.134
	X <sub>be</sub>	0.125	0.147	0.156	0.134
	X <sub>ce</sub>	0.375	0.353	0.344	0.366
	X <sub>de</sub>	0.375	0.353	0.344	0.366
	K <sub>x</sub>	9.00	5.77	4.86	7.46

X<sub>ae</sub>, X<sub>be</sub> : the mole fractions of reactants,  
 X<sub>ce</sub>, X<sub>de</sub> : the mole fractions of products,  
 K<sub>x</sub> : the experimental equilibrium constant.

Table 3. Activation parameters for the esterification of long chain fatty acids with 1,2-isopropylidene glycerol

Comp'd.	E <sub>m</sub> (kcal/mol)	ΔH <sup>‡</sup> (kcal/mol)	ΔG <sup>‡</sup> (kcal/mol)	-ΔS <sup>‡</sup> (e.u)
IPLG	7.8	7.1	24.3	52.5
IPMG	9.7	9.0	24.4	47.0
IPSG	11.4	10.8	24.8	42.8
IPOG	9.0	8.3	24.5	49.3

IPLG : 1, 2-isopropylidene 3-lauroyl glyceride  
 IPMG : 1, 2-isopropylidene 3-myristoyl glyceride  
 IPSG : 1, 2-isopropylidene 3-stearoyl glyceride  
 IPOG : 1, 2-isopropylidene 3-oleoyl glyceride



는 전이상태에서는 용매내에서는 전이상태 착물이 용해되기 힘들기 때문에 활성화효소와 complex가 형성된다. 이 반응의 활성화 파라미터는 많은 에스테르화 반응에서와 같이 전형적이 친핵성 2분자 반응을 나타내는 음의 활성화 엔트로피 값과 비교적 작은 엔탈피 값을 갖는다. 쌍극성 비수용매는 활성화효소에 의하여 생성된 glyceride이온의 친핵성도를 증가시켜 반응속도를 촉진시키며 활성화효소와 complex를 형성하는 극성 전이상태 착물을 만들며, 반응계에서 생성되는 물을 효율적으로 제거하므로써 반응효율이 좋아진다.

상쇄효과를 알아보기 위하여 활성화 엔트로피와 활성화 엔탈피를 도시하면 Fig. 11과 같다. 포화지방산의 경우 직선관계를 나타내며 각각의 활성화 엔트로피 사이에 1차 비례관계가 성립되었다. Leffler<sup>18)</sup>는 반응속도에 미치는 활성화 엔탈피항과 활성화 엔트로피항의 서로 상반되는 기여에 대하여 등속관계를 제안하였다. 본 연구에서 등속온도는 Fig. 11의 기울기로부터 β-374K로 구하여 졌다. 이와 같이 등속온도가 실험온도보다 훨씬 높은 경우에 반응속도는 주로 엔탈피항의 조절반응으로 나타난다. 이것은 Table 3에서와 같이 반응속도는 활성화 엔탈피값이

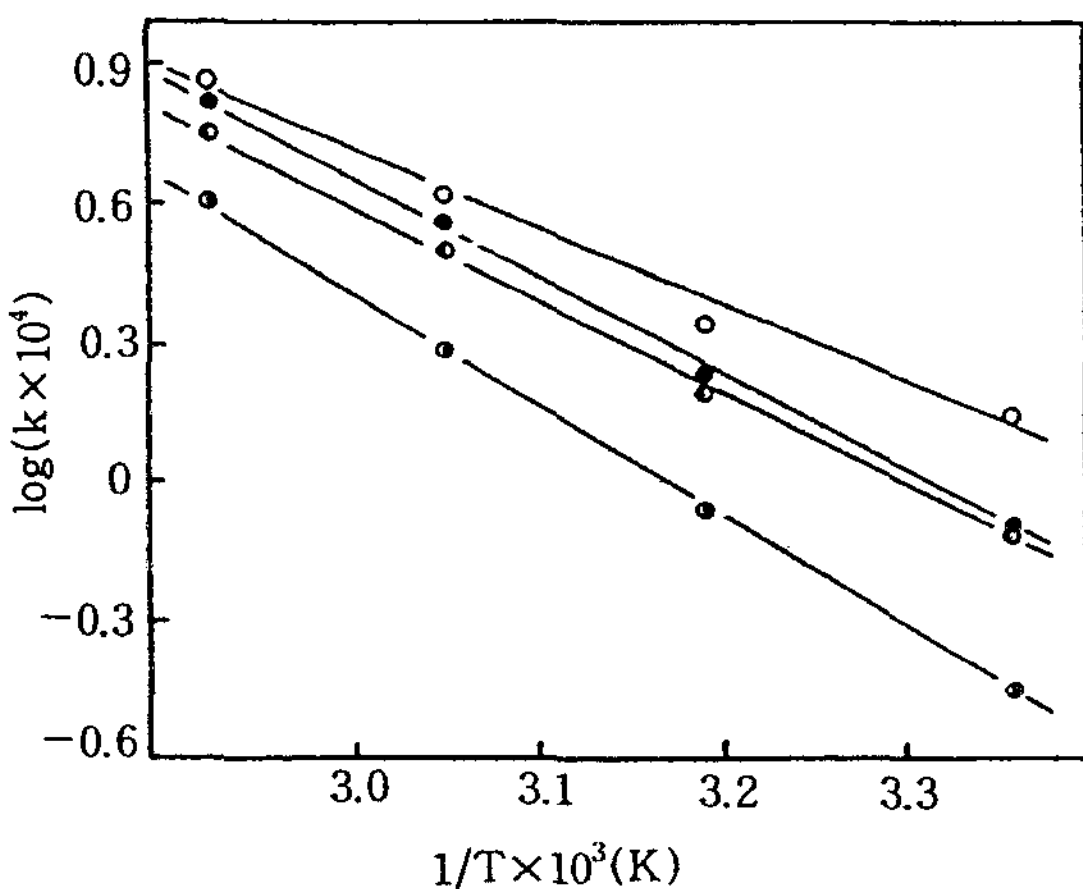


Fig. 10. Arrhenius plot for determination of activation energy in the enzyme catalyzed reaction.

- : 1, 2-isopropylidene 3-lauroyl glyceride
- : 1, 2-isopropylidene 3-myristoyl glyceride
- ◐ : 1, 2-isopropylidene 3-stearoyl glyceride
- ◑ : 1, 2-isopropylidene 3-oleoyl glyceride

커질수록 느리게 진행되는 것과 일치한다. 일반적으로 반응속도에 미치는 기질의 구조변화에 대한 효과는 엔탈피항에 포함되며, 효소촉매 효과는 엔트로피 인자에 기인되는 것이다. 반응속도가 활성화 엔탈피에 의존하는 것은 1,2-isopropylidene glycerol이 고급지방산과 각각의 계열반응에서 탄화수소의 탄소수가 달라지는 구조변화로 인한 것이다. 이러한 효과가 비록 작은 것이기는 하지만 소수성 부분의 탄화수소의 탄소수가 증가함에 따라 활성화 엔탈피 값이 증가하는 것은 정성적으로 결합 절단이 일어나는 정도가 커진다고 해석할 수 있다. 즉, 고급지방산의 탄소수가 증가하면 탄소수가 작은 에스테르의 전이상태보다 탄소수가 큰 것의 전이상태 착물이 더욱 탈용매화됨으로서 용매의 자유도가 증가함에 따라 활성화 엔탈피가 증가하게 될 것이고 이에 따라 전이상태착물의 해리가 증가하여 결합절단이 크게 일어나며 이는

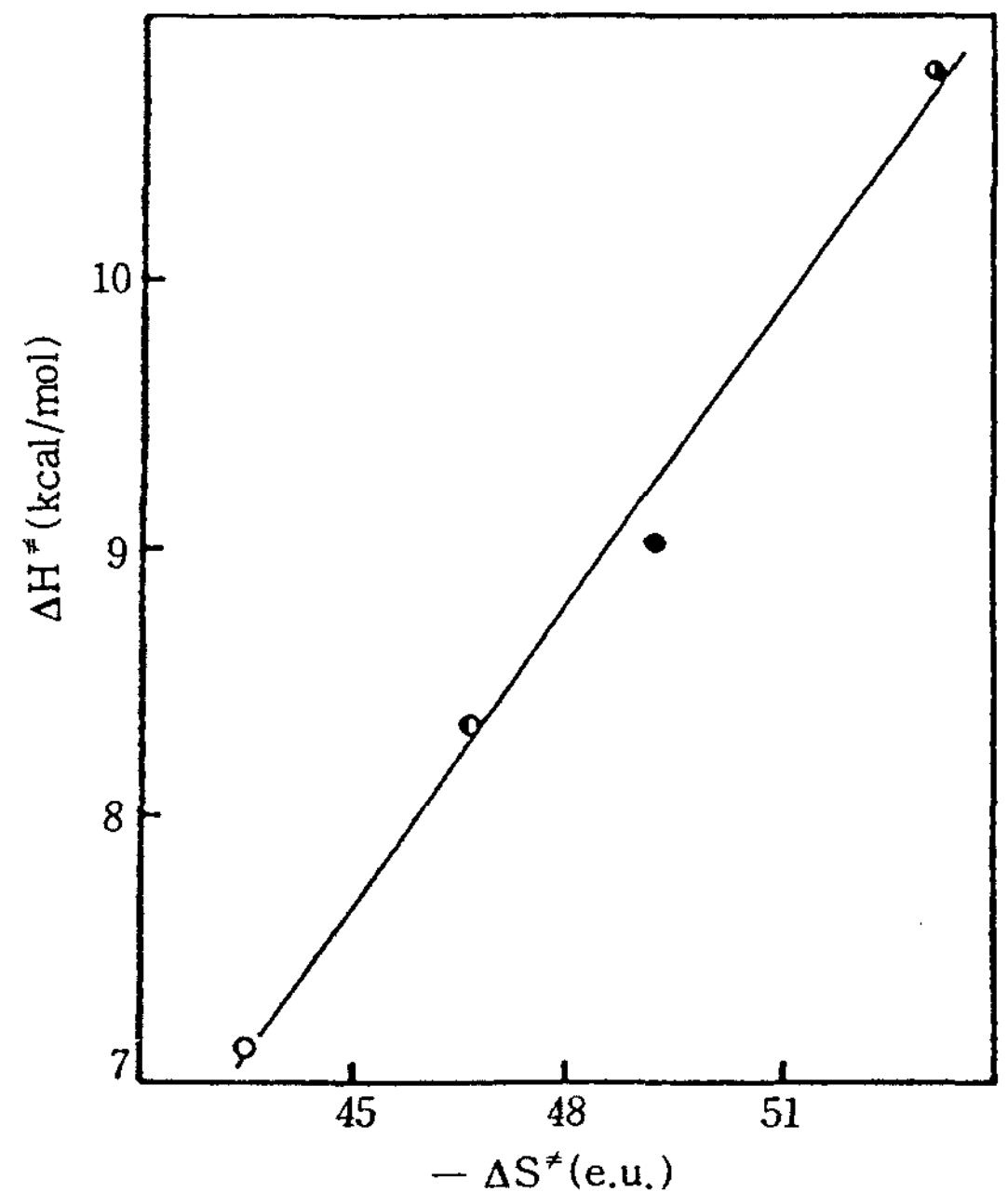


Fig. 11. Plot of entropy-enthalpy correlation for the enzymatic esterification with 1,2-isopropylidene glyceride and long chain fatty acid(β = 374°K).

- : 1, 2-isopropylidene 3-lauroyl glyceride
- : 1, 2-isopropylidene 3-myristoyl glyceride
- ◐ : 1, 2-isopropylidene 3-stearoyl glyceride
- ◑ : 1, 2-isopropylidene 3-oleoyl glyceride

활성화 엔트로피가 증가하는 결과가 된다.

## 결 론

이상의 결과로부터 다음의 결론을 얻었다.

1. 이 반응은 시행오차법에 의하여 2차 반응임을 알 수 있었고 가역 2차 반응속도식을 유도하였다. 이 반응의 최적온도는 55℃였고 소수성부분 탄화수소의 탄소수가 증가함에 따라 효소촉매 반응속도는 감소하는 경향을 나타내었고 같은 탄화수소를 갖는 oleic acid와 stearic acid에서는 불포화 결합을 갖는 oleic acid의 반응 속도가 보다 빨랐다.

2. 활성화 에너지, 활성화 엔트로피, 활성화 엔탈피는 모두 탄소수가 증가함에 따라 증가하였으며, oleic acid와 stearic acid에서는 2중 결합이 있는 oleic acid의 활성화 에너지가 작았다. 엔트로피 값이 모두 음의 값을 갖는데 이것은 친핵성 2분자 반응에서 전이상태에서의 부피 감소 및 전장의 증가 때문인 것으로 추측된다.

3. 용매 및 효소 촉매간의 상쇄효과를 활성화 엔탈피와 활성화 엔트로피 관계로부터 구한 결과( $\beta$ -374 K) 본 연구는 엔탈피 조절 반응임을 알 수 있었다.

## 문 헌

1. S. N. Zlatanov, A. N. Sagredos and V. P. Pappageorgiou, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1575 (1985)
2. T. N. Kumar, Y. S. R. Sastry and G. Lakshminarayana : *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **66**, 153 (1989)
3. P. E. E. Cook and A. J. Showler, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **87**, 4594(1965)
4. Van Fisher W., *Fette Seifen Anstrichm.*, **83**, 507 (1981)
5. T. Nismo, T. Chikano and M. Kamimura, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1203(1988)
6. W. M. Linfield, R. A. Barauskas, L. Sivieri, S. Serota and R. W. Stevenson, Sr., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **61**, 191(1984)
7. M. Buhler and C. Wandrey, *Henkel-Referate*, **24**, 134(1988)
8. Z. King and M. Leitzel, *Proceeding of ISF-JOCS World Congress, Tokyo*, 281(1988)
9. P. E. Sonnet, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **65**, 900 (1990)
10. A. Wiseman, *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd Edn., Ellis Horwood Limited, Chichester(1985)
11. M. Habulin and Z. Knez, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **67**, 775(1990)
12. Z. Knez, M. Leitzel, D. Zavrsmik and B. Lavric, *Fat. Science*, **92**, 169(199)
13. S. E. Godtfredsen, *European Pat.*, EP 215, 038 (1986)
14. K. Holmberg and E. Osterberg, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **65**, 154(1988)
15. P. Eigtved, T. T. Hanson and H. Sakaguchi, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **63**, 463(1986)
16. S. Pecnik and Z. Knez, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **69**(3), 261(1992)
17. K. J. Laidler, *Chem. Kinetics*, McGraw Hill, London(1965)
18. J. E. Leffler, *J. Org. Chem.*, **20**, 1202(1955)