

## 호소적 방법에 의한 방향족 알코올류 및 Monoterpene Alcohol류의 배당체 합성

김영희<sup>\*</sup> · 김삼곤 · 김근수 · 나도영 · Suzuki Yukio<sup>1</sup>  
KT&G중앙연구원, <sup>1</sup>오카야마대학 자원생물과학연구소  
(2003년 5월 28일 접수)

## Enzymatic Synthesis of $\beta$ -Glucosides of Aromatic Alcohols and Monoterpene Alcohols

Young-Hoi Kim<sup>\*</sup>, Sam-Kon Kim, Kun-Soo Kim, Do-Young Ra and Yukio Suzuki<sup>1</sup>  
KT&G Central Research Institute, <sup>1</sup>Research Institute for Bioresources, Okayama University  
(Received May 28, 2003)

**ABSTRACT:**  $\beta$ -Glucosidase-catalysed synthesis of glucosides with aromatic alcohols and monoterpene alcohols as acceptors and cellobiose as a donor in the presence of various commercial  $\beta$ -glucosidases were described.  $\beta$ -Glucosidases from *Aspergillus niger* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. and bitter almond have been shown to catalyze synthesis of  $\beta$ -glucosides of benzyl alcohol, 2-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, geraniol and citronellol in the presence of cellobiose as sugar donor. Among enzyme preparations tested, each  $\beta$ -glucosides prepared from *Aspergillus niger* were isolated in the pure state by Diaion HP-20 and silica gel column chromatography. The products were identified as  $\beta$ -glucosyl products of benzyl alcohol, 2-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl alcohol, 2-phenyl ethyl alcohol, geraniol and citronellol by spectrometry (UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR) and enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucosidase. Monoterpene alcohols with a sterically hindered hydroxyl group, such as linalool, *l*-menthol and  $\alpha$ -terpineol were not used as acceptors in transglycosylation reaction.

**Key words :** aromatic alcohols, monoterpene alcohols,  $\beta$ -glucosidase, enzymatic transglycosylation,  $\beta$ -glucosides

방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류는 식물체에서 얻어지는 정유(essential oil)의 주요 구성성분이면서 향료산업 분야에서 널리 사용되는 물질들이다. 종래에는 방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류들이 각종 식물체에서 유리형태 (free form)로만 존재하는 것으로 인식되어 왔으나

최근에는 이러한 성분들이 유리형태로 뿐만 아니라 당류와 결합된 배당체 (glycoside)의 형태로 식물체내에 존재한다는 사실이 밝혀졌다 (Stahl-Biskup *et al.*, 1993). 예로서 포도의 특징적인 향기발현에 방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류가 중요한 역할을 하는데 이 성분들의 상당부

\*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G중앙연구원

\*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea

분은 향기가 없는 배당체의 형태로 존재하며, 포도 주스나 포도주를 제조하는 과정에서 이러한 배당체가 포도에 함유된 효소나 발효과정에서 미생물이 생성하는 효소 또는 산성조건하에서 가수분해되어 향기를 지닌 유리형태의 방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류를 생성함으로써 포도 주스나 포도주의 향이 강화된다는 사실이 알려졌다 (Strauss *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1990; Mateo and Jiménez, 2000). 그 이후 각종 식물체의 잎이나 과일 및 꽃 등에서도 방향족 알코올류나 monoterpene alcohol의 배당체가 발견되어 식물 고유의 향기발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (Schwab *et al.*, 1989; Kobayashi, 1993; Watanabe *et al.*, 1993), 특히 방향족 알코올류는 잎담배에 있어서도 상당부분이 배당체 형태로 존재하여 담배의 향각미 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다 (Anderson *et al.*, 1976; Heckman *et al.*, 1981; Cai *et al.*, 2002). 일반적으로 유리형태의 방향족 알코올류나 monoterpene alcohol류는 지용성이어서 물에 잘 녹지 않고 휘발성이 강하기 때문에 향미개선을 목적으로 이러한 물질들을 담배에 사용하게 되면 잎담배의 가공과정이나 제품을 제조한 후 저장 또는 유통과정에서 휘산되어 제품의 품질을 악화시키는 원인이 되기도 한다. 이와 같은 문제점을 개선하기 위한 방안의 하나로써 비휘발성 유도체로 전환시키는 방법들이 많이 연구되고 있으며, 특히 분자내에 알코올기를 지닌 향기물질에 대해서는 화학적인 방법으로 당류를 결합시킨 배당체의 형태로 제조하여 활용하는 방법들이 보고된 바 있으나 (Anderson *et al.*, 1976; Herron, 1989; Voirin *et al.*, 1990) 화학적 방법에 의한 배당체 제조방법은 여러 단계의 화학적 반응을 거쳐야 하는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하는 방법으로서 최근에는 당 전이(transglycosylation) 활성을 지닌 효소를 이용하여 방향족 알코올류나 monoterpene alcohol류의 배당체를 제조하기 위한 연구가 시도된 바 있다 (Vic and Thomas, 1992; Gunata *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2000).

한편  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21;  $\beta$ -D-

glycoside glucohydrolase)는  $\beta$ -glucoside 결합을 하고 있는 화합물에 작용하여 비환원 말단의  $\beta$ -glucoside 결합을 분해하여  $\beta$ -D-glucose를 생성하는 효소이나 적당한 수용체가 있을 경우 분해한  $\beta$ -D-glucosyl기를 수용체에 전이시키는 활성도 동시에 지니고 있으며,  $\beta$ -glucosidase 활성을 지닌 각종 미생물 유래 효소들이 상업적으로 판매되고 있다. 따라서 본 연구에서는 방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류의 이화학적 성을 개선할 목적으로 시판되고 있는  $\beta$ -glucosidase 활성을 지니고 있는 각종 미생물 유래 효소를 이용하여 방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류의 배당체 합성을 시도한 바 그 결과를 보고코자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

방향족 알코올류인 benzyl alcohol (BA), 2-hydroxybenzyl alcohol (2-HBA), 4-hydroxybenzyl alcohol (4-HBA), 2-phenylethyl alcohol (2-PEA)과 monoterpene alcohol류인 geraniol, citronellol, linalool, *l*-menthol,  $\alpha$ -terpineol 및 당류인 cellobiose는 Nacalai Tesque사 (일본) 제품을 사용하였고, Diaion HP-20 수지는 Mitsubishi사 (일본) 제품을 사용하였다.  $\beta$ -Glucosidase 활성을 지닌 효소 (enzyme preparations)들은 Sigma사 (미국), Amano제약 (일본) 또는 Tokyo Kasei사 (일본)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 시판 특급을 구입하여 정제하지 않고 사용하였다.

### Thin layer chromatography (TLC)

TLC는 Merck사 (독일) 제품 Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> TLC plates를 사용하였고, 전개용매는 ethyl acetate-acetic acid-water (3:1:1, v/v/v) 혼합액을 사용하였다. TLC에 의해 분리된 성분의 검출은 20% 황산-에탄올을 분무후 110-120°C에서 10분간 가열하여 발색하였다.

### High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC 조건으로 칼럼은  $\mu$ -Bondasphere C<sub>18</sub> (3.9 mm x 15 cm, Nihon Water's, 일본), 분리용 매는 acetonitrile-water (29:71, v/v), flow rate는 분당 0.6 ml, 검출기는 Waters UV monitor 모델 401 (214 nm) 사용하였으며, 배당체로의 전환비율은 peak area (%)로 계산하였다.

#### 효소활성 측정

$\beta$ -Glucosidase 활성은 Unno 등의 방법 (1993)에 준하여 측정하였다. 즉 3.4 mM의 *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (*p*NPG)을 함유하는 초산완충용액 (pH 5.0)에 효소액을 가하여 전량을 0.8 ml로 한다음 30°C에서 일정시간 반응시켰다. 반응액 0.4 ml를 취해 100 mM의 sodium carbonate용액 10 ml를 가한다음 유리된 *p*-nitrophenol의 양을 420 nm에서 측정하였다. 이때 효소 활성 1 unit는 *p*NPG에서 분당 1.0  $\mu$ mol의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

#### 기기분석

Ultraviolet (UV)는 Hitachi사 (일본) 모델 EPS-3T UV spectrophotometer, Infrared (IR)는 Hitachi사 (일본) 모델 260-30 IR spectrophotometer를 사용하였다. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz)과 <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz)은 Varian사 (독일) 모델 VXR-500 spectrometer, 용매는 CD<sub>3</sub>OD 또는 CDCl<sub>3</sub>, 내부기준물질 (ISTD)은 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였다.

#### $\beta$ -Glucoside의 생성

당 공여체로서 cellobiose 1.0 g과 당 수용체로서 BA, 2-HBA, 4-HBA 또는 2-PEA 각각 0.2 g을 0.1 M 초산완충용액 (pH 4.8)에 용해시켜 10 ml로 한다음 각종 미생물 또는 식물 유래 효소 ( $\beta$ -glucosidase activity 65 units 함유)를 가한 다음 교반하면서 37°C의 암소에서 48시간 반응시켰다. 물에 용해성이 낮은 geraniol, citronellol, linalool, *l*-menthol 및  $\alpha$ -terpineol은 40%의 acetonitrile을 함유하는 초산 완충용액에 용해시킨 다음 20°C에서 72시간 반응시켰다. 반응액은 비등 수욕조상에서 약 5분간 가열하여 효소를 불활성화

시키고 membrane filter (0.45  $\mu$ m)로 여과한 다음 TLC 또는 HPLC 분석용 시료로 하였다.

#### 생성된 배당체의 분리 및 구조동정

당 공여체로서 cellobiose 10 g과 당 수용체로서 BA, 2-HBA, 4-HBA 또는 2-PEA 각각 0.2 g을 0.1 M 초산완충용액 (pH 4.8)에 용해시키고 여기에 *Asp. niger* 유래 cellulase (type II, Sigma사)를  $\beta$ -glucosidase로서 650 units가 함유되도록 첨가한 다음 37°C의 암소에서 교반하면서 48시간 반응시켰다. Monoterpene alcohol류인 geraniol, citronellol, linalool, *l*-menthol 및  $\alpha$ -terpineol은 각각의 화합물 0.2 g과 cellobiose 10 g을 40%의 acetonitrile을 함유하는 초산완충용액 (pH 4.8)에 용해시킨다음 20°C의 암소에서 72시간 반응시켰다. 각 반응액은 비등 수욕조에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 다음 반응하고 남은 수용체는 클로로포름으로 추출하여 제거하고 수용액층은 생성된 배당체를 분리하기 위하여 수포화 부탄올로 추출 후 농축하였다. 농축액은 Diaion HP-20을 충전한 칼럼 (2.0 x 40 cm)에 점적후 증류수로 세척하여 함유된 당류를 제거한 다음 40% 메탄올 수용액으로 생성물을 용출하였다. 용출액은 감압농축후 silica gel을 충전한 칼럼과 용출용매로서 클로로포름-메탄올 혼합액을 용출용매로 하여 생성물을 보다 더 분리하였다.

**생성물 I** (reaction product from BA) : colorless needles (absolute ethanol); mp: 111-112°C; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3500-3200, 1500, 1080  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  3.23-3.36 (4H, m), 4.35 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.66 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 4.93 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 7.25-7.42 (5H, m); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : Table 3.

**생성물 II** (reaction product from 2-HBA) : colorless needles (ethanol-acetone); mp: 109-111°C; UV<sub>max</sub> : 233, 270 nm; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3500-3200  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  3.26-3.38 (4H, m), 4.39 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.73 (1H, d, *J* = 11.9 Hz), 4.93 (1H, d, *J* = 11.9 Hz), 6.78-7.34 (4H, m); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : Table 3

**생성물 III** (reaction product from 4-HBA):

colorless needles (ethanol-acetone); mp: 153-155°C; UV<sub>max</sub> : 238, 278 nm; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 1520, 3550-3300 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  3.31-3.34 (4H, m), 4.70 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 4.73 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 4.89 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 6.81-7.36 (4H, m); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD): Table 3.

**생성물 IV** (reaction product from 2-PEA): colorless needles (ethanol-ethyl acetate); mp: 115-117°C; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3500-3200, 3010, 1490 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.32 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.13-7.26 (5H, m); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Table 3.

**생성물 V** (reaction product from geraniol): viscous oil; IR  $\nu_{\max}$  (neat): 3300, 1650, 1440, 1010 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.60 (3H, s), 1.66 (3H, s), 1.68 (3H, s), 2.04 (4H, m), 3.26 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 3.40 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 3.52 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 3.63 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 3.84 (2H, m), 4.20 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 4.33 (2H, m), 5.08 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 5.35 (1H, t, *J* = 6.7 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Table 3.

**생성물 VI** (reaction product from citronellol): viscous oil; IR  $\nu_{\max}$  (neat): 3350, 1640, 1450, 1030 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.89 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.60 (3H, s), 1.68 (3H, s), 3.30 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 3.38 (1H, t, *J* = 8.9 Hz), 3.55 (1H, t, *J* = 9.3 Hz), 3.60 (1H, t, *J* = 8.9 Hz), 4.30 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 5.08 (1H, t, *J* = 7.1 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Table 3.

### 결과 및 고찰

*Asper. niger* 유래  $\beta$ -glucosidase에 의한  $\beta$ -glucoside 생성

당 공여체로서 이당류인 cellobiose와 당 수용체로서 방향족 알코올류인 2-HBA 또는 2-PEA를 사용하여 예비실험에서  $\beta$ -glucosidase 활성을 나타낸 각종 미생물 유래 효소 및 bitter almond  $\beta$ -glucosidase를 반응시킨후 반응액을 대상으로 HPLC에 의해 배당체로 전이한 비율을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 본 실험에서 사용한 *Asp. niger*, *Trichoderma viride* 및 *Penicillium*속에서 유래하는 효소뿐만 아니라 식물인 bitter almond에서 분리한  $\beta$ -glucosidase에서도 당 전이활성이

Table 1. Yields (%)<sup>a</sup> of transglycosylation products by various enzyme preparations

Enzyme preparations	2-Hydroxybenzyl alcohol- $\beta$ -glucoside	2-Phenylethyl alcohol- $\beta$ -glucoside
<i>Asp niger</i>		
From Sigma Type II	41.1	18.3
From Tokyo Kasei C0057	22.8	16.3
From Amano CQ 10523	23.0	17.6
From Amano C006501	17.3	11.9
<i>Trichoderma viride</i>		
From Sigma C-9422	27.7	20.7
From Amano CT 010517	19.4	14.8
<i>Penicillium</i> spp.		
<i>P. funiculosum</i> (Sigma C-0901)	23.0	17.5
<i>P. decumbens</i> (Sigma H-1385)	14.3	8.0
Bitter almond (Sigma G-8625)	6.4	3.3

a : Yields as peak area (%) by HPLC analysis.

있었으나 그 중에서도 *Asp. niger*와 *Trichoderma viride*에서 유래하는 효소에서 당 전이활성이 컸다.

또한 Table 1에서 당 전이활성이 강한 것으로 나타난 *Asp. niger* cellulase (type II, Sigma사)를

사용하여 기타 방향족 알코올류 또는 monoterpene alcohol류와 cellobiose를 반응시킨 다음 반응액을 TLC로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보면 방향족 알코올류인 BA, 2-HBA, 4-HBA 및 2-PEA, monoterpene alcohol류인 geraniol 및 citronellol과 cellobiose를 반응시켰을 때 유리형태의 방향족 알코올류나 monoterpene alcohol류의  $R_f$ 값 ( $R_f$  0.9) 보다 낮아 각각의 배당체로 예상되는 새로운 성분들 ( $R_f$  0.5-0.8)이 생성되었으나 cellobiose를 함유하지 않은 상태에서 각각의 방향족 알코올류 또는 monoterpene alcohol류와 효소만을 반응시켰을 때에는 새로운 성분들이 생성되지 않았다. 또한 linalool, *l*-menthol 및  $\alpha$ -terpineol을 당 수용체로 사용했을 때에는 당 전이반응이 나타나지 않았다.

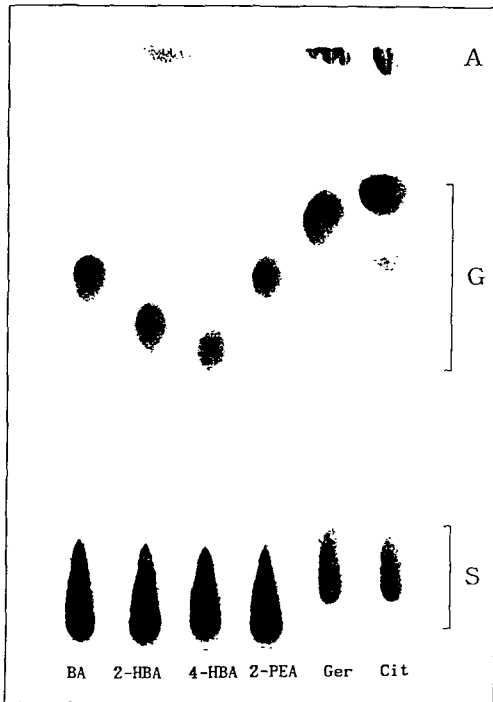


Fig. 1. Thin layer chromatograms of reaction products by  $\beta$ -glucosidase from *Asp. niger*.

- BA : benzyl alcohol
- 2-HBA : 2-hydroxybenzyl alcohol
- 4-HBA : 4-hydroxybenzyl alcohol
- 2-PEA : 2-phenylethyl alcohol
- Ger : geraniol
- Cit : citronellol
- A : aglycones
- G : the  $\beta$ -glucosyl-like compounds
- S : sugar.

The reaction was done under the condition described in materials and methods. TLC was done with ethyl acetate-acetic acid-water (3:1:1, v/v/v) and spots were detected by heating at 110-120°C for 10 min after being sprayed with 20% sulfuric acid in ethanol.

#### 생성된 성분들의 분리 및 구조동정

각각의 반응액으로부터 배당체의 생성수율 (peak area %)을 HPLC로 분석한 결과 및 각각의 배당체를 Diaion HP-20 및 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 순수 분리한 다음 이화학적 특성 (TLC에서  $R_f$  값, mp, UV  $\lambda_{max}$ )을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

배당체 생성수율은 7.8~41.1%로 사용한 수용체에 따라 차이를 나타냈으며, 대체적으로 monoterpene alcohol류 보다는 방향족 알코올류에서 생성수율이 높은 편이었다. 또한 각각의 생성물이 배당체인지를 확인하기 위하여 생성물을 순수분리한 다음 각종 기기분석을 통해 구조를 동정하였다. BA와 cellobiose의 반응액으로부터 분리한 생성물 I은 IR 스펙트럼에서 aromatic ring ( $1500\text{ cm}^{-1}$ )과 hydroxyl기 ( $3500\text{-}3200, 1080\text{ cm}^{-1}$ )의 존재가 시사되었고,  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서  $\delta$  4.66 (1H, d,  $J = 11.8\text{ Hz}$ )과  $\delta$  4.93 (1H, d,  $J = 11.8\text{ Hz}$ )에서 benzylic methylene에 기인하는 AB-type signal, 1개의 anomeric proton signal ( $\delta$  4.35, 1H, d,  $J = 7.8\text{ Hz}$ ), aromatic proton signal ( $\delta$  7.3-7.4, 5H, m) 및 glucosyl기 ( $\delta$  3.2-3.4, 4H, m)의 존재가 관측되었다. 또한 Table 3에서 보는바와 같이  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서도 BA와 glucosyl기의 존재가 관측되었으며, 유리형태의 BA의

Table 2. Yields and chemical properties of  $\beta$ -glucosyl compounds of aromatic alcohols and monoterpene alcohols formed by *Asp. niger* cellulase.

$\beta$ -Glucoside	Yield (%) <sup>a</sup>	R <sub>f</sub> value <sup>b</sup>	mp (°C)	UV $\lambda_{max}$
Benzyl- $\beta$ -glucoside (I)	27.1	0.63	111 - 112	-
2-Hydroxybenzyl-7- $\beta$ -glucoside (II)	41.1	0.55	109 - 111	270, 233
4-Hydroxybenzyl-7- $\beta$ -glucoside (III)	22.2	0.50	153 - 155	238, 278
2-Phenylethyl- $\beta$ -glucoside (IV)	18.3	0.63	115 - 117	-
Geranyl- $\beta$ -glucoside (V)	10.4	0.74	Viscous oil	-
Citronellyl- $\beta$ -glucoside (VI)	7.8	0.77	Viscous oil	-

a: Peak area (%) by HPLC; b: ethyl acetate:acetic acid:H<sub>2</sub>O=3:1:1, v/v/v

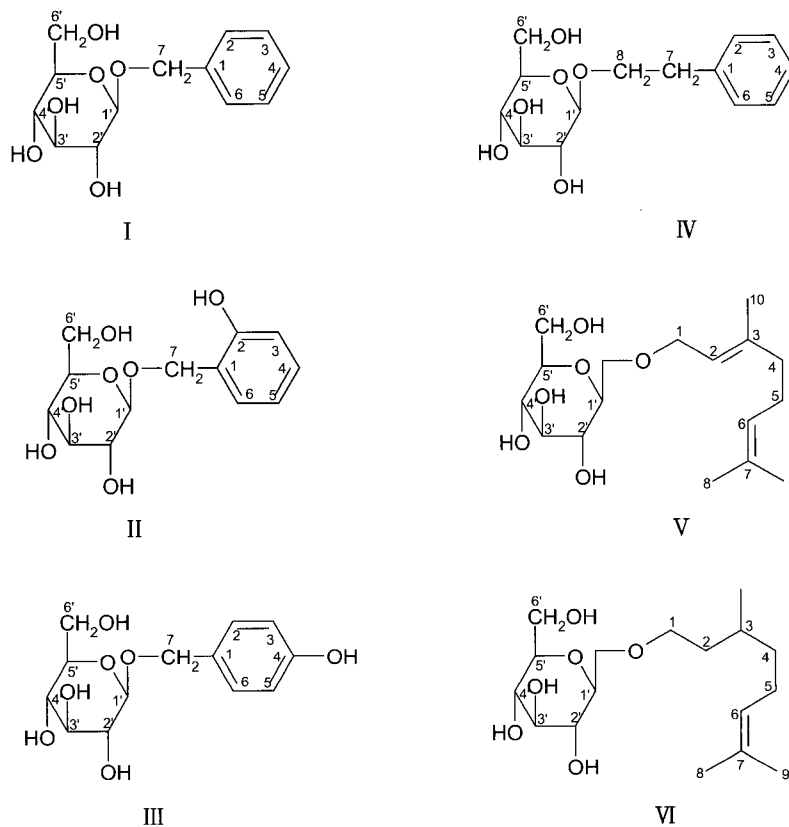


Fig. 2. Structures of reaction products formed by  $\beta$ -glucosidase from *Asp. niger*.

I : benzyl-  $\beta$ -D-glucopyranoside(G)

III: 4-hydroxybenzyl-  $\beta$ -D-G

V : geranyl-  $\beta$ -D-G

II : 2-hydroxybenzyl-  $\beta$ -D-G

IV: 2-phenylethyl-  $\beta$ -D-G

VI: citronellyl-  $\beta$ -D-G.

<sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼과 비교했을 때 C-7 탄소의 signal은 저자장쪽으로 δ 6.4 정도, C-1 탄소 signal은 고자장쪽으로 δ 3.7 정도 이동하여 관측되어 생성물 I은 Fig. 2에서와 같이 BA에 glucose가 1분자 결합된 benzyl-β-D-glucopyranoside인 것으로 판명되었다. 이 배당체는 각종 식물체에 널리 존재하며 잎담배에도 존재한다는 것이 이미 밝혀져 있다 (Heckman *et al.*, 1981; Ito *et al.*, 2000).

2-HBA와 cellobiose의 반응액으로부터 분리한 생성물 II는 IR 스펙트럼에서 역시 hydroxyl기 (3500-3200 cm<sup>-1</sup>)의 존재가 시사되었고, <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 (CD<sub>3</sub>OD)에서는 δ 4.73 (1H, d, J = 11.9 Hz)과 δ 4.93 (1H, d, J = 11.9 Hz)에서 benzylic methylene에 기인하는 AB-type signal, 1개의 anomeric proton signal (δ 4.39, 1H, d, J = 7.8 Hz), δ 6.78-7.34 (4H, m)에서 aromatic proton signal 및 δ 3.26-3.38 (4H, m)에서 glucosyl기에 기인하는 signal이 검출되었다. 또한

<sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 2-HBA와 glucosyl기에 기인하는 signal이 관측되었고, 유리형태의 2-HBA와 비교했을 때 2-HBA moiety의 C-7 탄소의 signal이 저자장쪽으로 δ 6.70 정도 이동한 반면 C-2 탄소의 signal이 고자장쪽으로 δ 3.31 정도 이동하여 관측되었으며 이러한 결과를 바탕으로 생성물 II는 2-hydroxybenzyl-7-β-D-glucopyranoside로 판명하였다. 또한 4-HBA와 cellobiose의 반응액으로부터 분리한 생성물 III은 IR 스펙트럼에서 aromatic ring (1520 cm<sup>-1</sup>)과 hydroxyl기 (3550-3300 cm<sup>-1</sup>)의 존재가 시사되었고, <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 (CD<sub>3</sub>OD)에서는 δ 4.70 (1H, d, J = 11.8 Hz)과 δ 4.89 (1H, d, J = 11.8 Hz)에서 benzylic methylene에 기인하는 AB-type signal과 1개의 anomeric proton signal (δ 4.73, 1H, d, J = 7.7 Hz), δ 6.81-7.36 (4H, m)에서 aromatic proton signal 및 δ 3.31-3.34 (4H, m)에서 glucosyl기에 기인하는 signal이 검출되었다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 유리형태의 4-HBA와 비

Table 3. <sup>13</sup>C-NMR spectral data of β-glucosyl compounds

Carbon number	I	II	III	IV	V	VI
Aglycone moiety						
1		156.6	129.7	138.0	<u>65.9</u>	<u>68.9</u>
2	139.1	125.2	131.1	128.5	119.7	36.6
3	129.2	120.6	116.0	128.9	141.4	29.6
4	129.3	116.3	158.3	126.4	39.7	37.2
5	128.7	131.1	116.0	128.9	26.4	25.7
6	129.3	130.1	131.3	128.5	123.9	124.6
7	129.2	<u>67.9</u>	<u>71.7</u>	36.0	131.7	131.3
8	<u>71.7</u>			<u>69.3</u>	16.4	17.7
9					17.7	19.5
10					25.7	25.4
Glucose moiety						
1'	103.3	103.5	102.8	102.8	101.4	102.8
2'	75.1	75.2	75.1	73.3	73.2	73.4
3'	78.1	78.1	78.1	76.3	75.6	76.3
4'	71.7	71.7	71.7	71.0	69.3	69.5
5'	78.0	78.1	78.0	75.5	76.4	75.5
6'	62.8	62.8	62.8	61.3	61.3	61.5

  : β-glucosylation site.

교했을 때 4-HIBA의 C-7 탄소의 signal이 저자장 쪽으로  $\delta$  5.09, C-1 탄소 signal은 고자장 쪽으로  $\delta$  5.33 정도 이동되어 이 성분이 4-hydroxybenzyl-7- $\beta$ -D-glucopyranoside로 판명되었다. 2-PEA와 cellobiose의 반응액으로부터 분리한 생성물 IV는 IR 스펙트럼에서 역시 benzyl기 (3010, 1490  $\text{cm}^{-1}$ )와 hydroxyl기 (3500-3200  $\text{cm}^{-1}$ )의 존재가 시사되었고,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 스펙트럼에서는  $\delta$  7.13-7.26 (5H, m)에서 aromatic proton signal,  $\delta$  4.32 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz)에서 anomeric proton signal이 검출되었고,  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼에서 2-PEA와 glucosyl기의 존재가 시사되었다.

또한 유리형태의 2-PEA와 비교했을 때 C-8 탄소 signal이 저자장 쪽으로  $\delta$  6.70 정도, C-7 탄소 signal은 고자장 쪽으로  $\delta$  3.31 정도 이동된 것으로 보아 이 성분이 2-phenylethyl-8- $\beta$ -D-glucopyranoside임을 알 수 있었다. 이 배당체는 식물체에 널리 존재하며 잎담배에도 존재한다는 것이 이미 밝혀져 있다 (Heckman *et al.*, 1981; Ito *et al.*, 2000).

Geraniol과 cellobiose의 반응액으로부터 분리한 생성물 V는 점조한 액체상 물질로서 IR 스펙트럼에서 hydroxyl기 (3300  $\text{cm}^{-1}$ ) 이외에도 1650, 1440, 1010  $\text{cm}^{-1}$ 에서 흡수 band가 나타났고,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 스펙트럼에서  $\delta$  1.60 (3H, s), 1.66 (3H, s) 및  $\delta$  1.68 (3H, s)에서 3개의 methyl signal,  $\delta$  5.08 (1H, t,  $J = 6.7$  Hz)과  $\delta$  5.35 (1H, t,  $J = 6.7$  Hz)에서 2개의 vinylic proton signal,  $\delta$  4.20 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz)에서 anomeric proton signal이 검출되었다. 또한  $^{13}\text{C-NMR}$  분석결과에서도 geraniol과 glucosyl기의 존재가 확인되었고, 유리형태의 geraniol과 비교했을 때 geraniol moiety C-1 탄소의 signal이 저자장 쪽으로  $\delta$  6.50, C-2 탄소 signal은 고자장 쪽으로  $\delta$  3.31 정도 이동되어 나타난 결과로 이 화합물은 geraniol의 hydroxyl기에 glucose가 1분자 결합된 geranyl- $\beta$ -D-glucopyranoside로 판명되었다. 이 배당체의 경우 잎담배에서는 발견되지 않았으나 식물체의 잎이나 과일에 널리 분포하는 것으로 알려져 있다. (Stahl-Biskup *et al.*, 1993; Mateo and Jiménez, 2000). Citronellol과 cellobiose와의 반응

액으로부터 분리한 생성물 VI 역시 점조한 액체상 물질로서 IR 스펙트럼에서는 3350  $\text{cm}^{-1}$ 에서 hydroxyl기에 기인한 흡수 band 이외에도 1640, 1450 및 1030  $\text{cm}^{-1}$ 에서 흡수 band가 나타났고,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 스펙트럼에서 3개의 methyl signal 이외에도  $\delta$  4.30 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz)에서 1개의 anomeric proton signal 및 5.08 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz)에서 1개의 vinylic proton signal이 검출되었다. 또한 Table 3의  $^{13}\text{C-NMR}$  분석결과로부터 이 생성물이 citronellol에 glucose 1분자가 결합된 citronellyl- $\beta$ -D-glucopyranoside을 알 수 있었으며, 위에서의 생성물 모두 anomeric proton signal의 coupling constant ( $J$ )가 7.7-7.8 Hz 범위인 것으로 보아 Fig. 2에서와 같이  $\beta$ -glucoside임을 알 수 있었다.

한편 linalool,  $\ell$ -menthol 및  $\alpha$ -terpineol은 본 실험에서 사용한 모든 효소에서 관련 배당체의 생성이 관찰되지 않아 당 수용체로서의 역할을 하지 못하는 것으로 나타났다. 효소를 이용한 배당체 합성에 있어서 입체적 장애를 받는 알코올기(sterically hindered hydroxyl group)에는 당이 전이되기 어려운 것으로 알려져 있다 (Gunata *et al.*, 1994). 따라서 linalool,  $\ell$ -menthol 및  $\alpha$ -terpineol을 당 수용체로 사용하였을 때 당 전이가 일어나지 않은 것은 입체적 장애에 기인하는 것으로 판단되며, 본 실험에서 제조된 배당체 모두가 수용성이면서 향기를 지니고 있지 않았으나 이를 다시 bitter almond  $\beta$ -glucosidase를 사용하여 가수분해 시켰을 때에는 각각 유리형태의 화합물과 함께 각각의 화합물이 지닌 독특한 향기가 발현되었다. 또한 본 실험에서 효소에 의한 배당체의 합성은 화학적 합성법보다 과정이 단순한 장점이 있으나 화학적 방법에 비해 배당체 생성 수율이 낮기 때문에 수율 향상을 위한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

식물체에 함유된 정유의 주요 구성성분이면서 향료 원료로 널리 사용되는 방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류의 이화학성 개선을 목적으로



로 효소적 방법에 의한 배당체 합성을 시도하였다. 당 공여체로서 cellobiose와 당 수용체로서 방향족 알코올류인 benzyl alcohol, 2-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, monoterpene alcohol류로서 geraniol, citronellol을 함유하는 혼합액에  $\beta$ -glucosidase 활성을 지닌 *Asp. niger* cellulase (type II, Sigma사)를 반응시킨 결과 각각의 배당체로 간주되는 당 전이 생성물이 검출되었으며, 당 전이수율은 수용체로 사용된 화합물에 따라 7.8~41.1% 수준이었다. 각각의 반응액으로부터 Diaion-HP 20 칼럼 및 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 생성물을 분리한 다음 기기분석 (UV, IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) 및  $\beta$ -glucosidase에 의한 가수분해 특성 조사결과 당전이 생성물은 각각의  $\beta$ -glucoside인 것으로 판명되었다. 이들 배당체는 수용성이면서 향기를 지니고 있지 않았으나 이를  $\beta$ -glucosidase로 가수분해시켰을 때 원래의 향기를 지닌 유리형태의 방향족 알코올류와 monoterpene alcohol류를 생성하였으며, linalool,  $\ell$ -menthol 및  $\alpha$ -terpineol은 본 실험에서 사용한 모든 효소에서 당전이 반응이 일어나지 않았다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, R. C., D. M. Gunn and J. A. Gibson (1978) Great Britan Patent 1508616.
- Cai, J., B. Liu, P. Ling and Q. Su (2002) Analysis of free and bound volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in uncased and cased tobaccos. *J. Chromatogr.* 947 ; 267-275.
- Gunata, Z., M. J. Vallier, J. C. Sapia, R. Baumes and C. Bayonove (1994) Enzymatic synthesis of monoterpene  $\beta$ -D-glucosides by various  $\beta$ -glucosidases. *Enzyme Microb. Technol.* 16 ; 1055-1058.
- Heckman, R. A., M. F. Dube, D. Lynn and J. M. Rivers (1981) The role of tobacco precursors in cigarette flavor. *Res Adv. Tob. Sci.* 7 ; 107-153.
- Herron, B. N. C. (1989) Tobacco product containing side stream smoke flavorant. U. S. Patent 4,804,002.
- Ito, K., Y. Tanabe, S. Kato, T. Yamamoto and A. Saito (2000) Glycosidic fraction of flue-cured tobacco leaves: Its separation and component analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(3) ; 584-587.
- Kitahata, S. (1990) Synthesis of oligosaccharides using microbial enzymes. *Denpun Kagaku* 37 ; 59-67.
- Kobayashi, A. (1993) Flavor precursors : Trend of flavor research. *Koryo(Japan)* 180 ; 69-75.
- Mateo, J. J. and M. Jiménez (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr.* 881 ; 557-567.
- Park, J. Y., S. O. Lee and T. H. Lee (1999) Synthesis of 1-O-benzyl- $\alpha$ -glucoside and 1-O-benzyl- $\alpha$ -maltoside by transglycosylation of  $\alpha$ -amylase from soluble starch in aqueous solution. *Biotechnol. Lett.* 21 ; 81-86.
- Schwab, W., C. Mahr and P. Schreier (1989) Studies on the enzymatic hydrolysis of bound aroma components from *Carica papaya* fruit. *J. Agric. Food Chem.* 37 ; 1009-1012.
- Shin, H. K., J. I. Kong, J. D. Lee and T. H. Lee (1999) Synthesis of hydroxybenzyl- $\alpha$ -glucosides by amyloglucosidase-catalyzed transglycosylation. *Biotechnol. Lett.* 22 ; 321-325.
- Stahl-Biskup, E., F. Intert, J. Holthuijzen, M. Stengele and G. Schulz (1993) Glycosidically bound volatiles-A review 1986-1991. *Flavour Fragr. J.* 8 ; 61-80.
- Strauss, C. S., P. R. Gooley, B. Wilson and P. J. Williams (1987) Application of droplet countercurrent chromatography to the analysis of conjugated forms of terpenoids, phenols and other constituents of grape juice *J.*

- Agric. Food Chem.* 35 ; 519-524
- Suzuki, Y., Y. H. Kim, K. Uchida and M. Takami (1996) Enzymatic synthesis of glycosylated and phosphatidylated biologically active compounds. *J. Appl. Glycosci.* (Japan) 43(2) ; 273-282.
- Unno, T., T. Ide, T. Yazaki, T. Nakukuki and G. Okada (1993) High recovery purification and some properties of a  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(12) ; 2172-2173.
- Vic, G. and D. Thomas (1992) Enzyme-catalysed synthesis of alkyl  $\beta$ -D-glucosides in organic media. *Tetrahedron Lett.* 33(32) ; 4567-4570.
- Voirin, S., R. Baumes and C. Bayonove (1990) Synthesis and n. m. r spectral properties of grape monoterpenyl glycosides. *Carbohydr. Res.* 207 ; 39-56.
- Watanabe, N., S. Watanabe, R. Nakajima, J. H. Moon, K. Shimokihara, J. Inagaki, H. Etoh, T. Asai, K. Sakata and K. Ina (1993) Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzyme action during flower opening. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(7) ; 1101-1106.
- Williams, P. J., C. R. Strauss, B. Wilson and R. A. Massy-Wastropp (1982) Novel monoterpene disaccharide glycoside of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* 21 ; 2013-2020.