

베타-갈락토시데이즈를 이용하여 합성된 Benzyl Alcohol Galactoside의 NMR Spectroscopy 및 Mass spectrometry

이향열 · 정경환[†]

한국교통대학교 생명공학과

(2019년 3월 8일 접수: 2019년 3월 19일 수정: 2019년 3월 22일 채택)

NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry of Benzyl Alcohol Galactoside synthesized using β -Galactosidase

Hyang-Yeol Lee · Kyung-Hwan Jung[†]

*Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation,
Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Republic of Korea*

(Received March 8, 2019; Revised March 19, 2019; Accepted March 22, 2019)

요약 : 대장균 효소 β -gal를 이용하여 합성된 BzO-gal의 분자구조를 NMR (^1H -와 ^{13}C -)과 고성능 mass spectrometry를 이용하여 분석하였다. BzO-gal은 ^1H NMR에서 14개의 proton으로부터 12개의 피크를 나타내었다. 방향족 고리에서 오는 5개의 proton 피크와 벤질기의 CH_2 에서 오는 2개의 proton 피크는 벤질알코올이 존재함을 나타낸다. 지방족 사슬 영역인 δ_{H} 4.32 ~ 3.46 ppm에서 나타나는 7개의 proton 피크로부터 단당류가 도입되었음을 확인할 수 있었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 나타난 11개의 carbon 피크도 또한 벤질알코올에 단당이 도입되었음을 나타낸다. BzO-gal의 분자량을 확인하기 위하여 mass spectrometry로 분석한 결과 m/z 가 293.0994인 BzO-gal의 sodium adduct ion ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 세포독성이 감소된 첨가물 개발을 기대하고 있으며, 추가적인 후속연구를 진행할 예정이다.

주제어 : 벤질알코올, 베타-갈락토시데이즈, 갈락토오스 전달반응, 핵자기공명분석, 질량분석

Abstract : To characterize the molecular structure of BzO-gal synthesized using *Escherichia coli* β -gal, NMR (^1H - and ^{13}C -) spectroscopy and mass spectrometry of BzO-gal were conducted. ^1H NMR spectrum of BzO-gal showed multiple peaks corresponding to the galactosyl group, which is an evidence of galactosylation on BzOH. Five proton peaks around the aromatic region at δ_{H} 7.43 ~ 7.24 ppm and 2 peaks from δ_{H} 4.93 and 4.67 ppm were evidence of the presence of the benzyl group. Seven proton peaks at δ_{H} 4.32 ~ 3.46 ppm showed the presence of a monosaccharide and

[†]Corresponding author
(E-mail: khjung@cjnu.ac.kr)

were indicative of galactosylation on BzOH. ^{13}C NMR spectrum also revealed the presence of 11 carbons suggestive of BzO-gal. The mass value (sodium adduct ion of BzO-gal, $m/z = 293.0994$) from mass spectrometry analysis of BzO-gal, and ^1H and ^{13}C NMR spectral data were in good agreement with the expecting structure of BzO-gal. We are expecting that through future study it will eventually be able to develop a new additive of low cytotoxicity.

Keywords : Benzyl alcohol galactoside, β -Galactosidase, Transgalactosylation, NMR spectroscopy, Mass spectrometry

1. 서론

다양한 분야에 사용되는 화합물의 독성과 알러지 문제를 해결하기 위한 방법으로 galactose 한 분자를 화합물에 결합시켜서 galactoside 유도체를 합성하려는 시도가 있어왔다[1,2]. 이러한 반응에서 가수분해 효소를 이용하는 방법을 transgalactosylation (혹은 reverse hydrolysis) 이라고 하며, 그 동안 본 연구팀에서는 이 방법을 이용하여 chlorphenesin (CPN) [3,4], 2-phenoxyethanol (PE) [5,6], 1, 2-hexanediol (HD) [7,8] 분자의 galactoside 유도체 합성을 시도하였다. 합성된 CPN, PE, 그리고 HD의 galactoside 유도체(CPN-gal, PE-gal, 그리고 HD-gal)를 인간 피부세포 (HaCaT cell)에 적용하였을 때, 세포에 대한 독성이 CPN, PE, 그리고 HD에 비하여 현저하게 감소되는 것을 관찰하였다[3,5,9]. 즉, 피부세포에 대한 독성이 galactose 한 분자 결합으로 감소되는 것을 확인하였다. 또한, HD-gal의 경우에는 galactose 한 분자가 결합하면서 보습력이 증가하는 현상도 관찰되었다[10].

이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 benzyl alcohol (BzOH) 분자에 galactose 한 분자를 결합 시키는 연구를 실시하였다. BzOH는 현재 식품 산업, 화장품 산업, 그리고 제약 산업에서 착향제와 방부제로서 많이 사용되고 있으나, BzOH 사용 중 발생하는 독성 문제와 피부 알러지 문제가 몇몇 보고를 통하여 알려지고 있다[11-14]. 그래서, 본 논문에서는 BzO-gal을 대장균 β -galactosidase (β -gal)를 이용하여 transgalactosylation 방법으로 합성하고 순수 분리한 후, BzO-gal 추정 물질에 대한 ^1H - and ^{13}C -NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy, 그리고 mass spectrometry 연구를 수행한 결과에

대하여 논하려고 한다. 이를 통하여, BzOH 분자의 -OH group에 한 분자의 galactose가 결합한 BzO-gal가 합성되었다는 실험적 증거를 제시하고, 이러한 결과를 근거로 독성이 감소된 BzO-gal 합성의 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

앞으로 이러한 결과를 바탕으로 인간피부세포에 대한 독성 문제가 해결된 첨가물을 개발할 수 있을 것으로 기대되며, 이를 위하여 BzO-gal의 피부세포에 대한 독성 시험 그리고 항균시험 등을 계속 실시할 예정이다.

2. 실험방법

2.1. 시약

Benzyl alcohol은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, TLC (thin-layer chromatography) plate는 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Germany)의 precoated plates SIL HD UV₂₅₄ (MN809222)를 사용하였다. BzO-gal 정제를 위한 Silica gel은 Zeochem (Uetikon am See, Switzerland)의 ZEOprep 60 (60-200 μm)을 사용하였고, 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

2.2. β -Gal을 생산하는 재조합 대장균

대장균의 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 vector를 사용하여 대장균을 발현 숙주로 하여 재조합 β -gal 효소를 발현하였다. 재조합 대장균제작과 재조합 β -gal을 함유한 대장균의 배양방법 등에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기록하였다[15].

2.3. β -Gal 함유 대장균을 이용한 BzO-gal 합성 및 정제

50 mM phosphate buffer (pH 7.5)를 이용하여 50 ml conical tube에서 350 g/l lactose, 0.75 U/ml β -gal, 185 mM BzOH를 녹인 후, shaking incubator (40°C, 100 rpm) 에서 48 시간 동안 반응시켜 BzO-gal을 합성하였다. 그리고, 9 ml의 반응액과 9 ml ethyl acetate (EA)를 50 ml conical tube에 넣어 섞은 후, 물과 EA층으로 분획하여 EA층으로 잔여 BzOH를 제거하고, 물 층으로 합성된 BzO-gal 추정 물질을 분획하였다. 이러한 분획은 총 3회 실시하였고, 나머지 반응액도 이러한 분획을 계속 실시하여 잔여 BzOH가 제거되고, BzO-gal 추정 물질이 모여있는 물 층만을 모았다. 선행연구와 같은 조건으로 EA 추출로 모아진 8 ml의 물 층을 silica gel chromatography에 loading 하여, 정제를 실시하였다 (이동상, EA : Methanol : DW = 17 : 2 : 1). BzO-gal로 추정되는 물질이 포함된 분획을 모아서 TLC 분석으로 확인한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 자세한 조건과 방법은 선행연구에 상세히 기술하였다[16,17]. 이 농축 물질이 BzO-gal 이라는 것을 확인하기 위하여 NMR spectroscopy와 mass spectrometry 분석을 실시하였다.

2.4. TLC 분석

20 × 10 cm TLC plate에 1.0 μ l 시료를 loading하고 을 이동상 (acetonitrile : water = 85 : 15 (v/v)) 으로 15 분 전개하였다. 그리고 staining solution (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 ml 10% NaOH in 200 ml water)를 TLC plate에 뿌린 후, 80°C oven에서 15 분간 말려서 밴드를 확인 하였다.

2.5. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy

400 MHz NMR Spectrometer (Bruker Ascend 400, Bruker, Germany)를 이용한 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 분석을 하였다. 이 때, 사용한 solvent는 CD₃OD이며, 정제된 BzO-gal 추정 물질을 약 20 mg 1000 μ l CD₃OD에 녹여 NMR 시료로 사용하였다.

2.6. Mass spectrometry

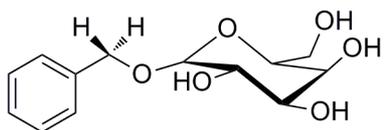
정제된 BzO-gal 추정 물질의 질량 분석은 고분해능 Q-TOF mass spectrometer

(MicroQTOF III, Bruker Co.)를 사용하여 실시하였다. Ionization source는 ESI (electrospray ionization)으로, analyze type은 time of flight (TOF)로 물질의 m/z (mass to charge ratio)를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy

BzO-Gal의 ¹H NMR 스펙트럼은 BzOH에 갈락토실화가 되었음을 보여주는 다양한 피크가 나타나 있다(Fig. 1). ¹H NMR 스펙트럼의 다운필드인 δ_H 7.43~7.24 ppm에 나타나는 피크들은 BzOH의 방향족기가 존재함을 나타낸다. 벤질기의 CH₂는 카이랄 탄소에 이웃해 있지 않음에도 불구하고 인접한 위치에 치환된 큰 사이즈의 당과 상호작용으로 두 개의 피크로 나뉘어 δ_H 4.93과 4.67 ppm에 각각 나타났다. 당류에서 특징적으로 나타나는 영역인 δ_H 4.32, 3.84와 3.82~3.46 ppm에서 7개의 수소로부터 나타나는 피크들이 나타나는 것으로 보아 이들이 BzOH에 갈락토스와 같은 단당이 도입되었음을 확인할 수 있었다. Absolute configuration에 관해서는, 일반적으로 transglucosylation 또는 transgalactosylation반응의 생성물은 anomeric position의 conformation이 유지가 된다고 알려져 있으므로 β -gal에 의해 생합성된 본 반응의 생성물도 β -anomer일 것으로 추정된다[18]. 기존 연구로써 chlorophenesin, 2-phenoxyethanol 및 1, 2-hexanediol 등의 다양한 화장품용 살균제를 galactosylation acceptor로써 사용하여 갈락토사이드 생성물을 합성하였다[3,5,7]. 방향족 알코올인 chlorophenesin 및 2-phenoxyethanol을 사용하였을 경우 β -anomer만 특이적으로 생성되었다[3,5]. 특이하게도 지방족 알코올인 1, 2-hexanediol을 사용한 galactosylation 반응은 β -anomer와 α -anomer가 racemic mixture처럼 섞여 생성되어 입체특이적 반응을 보이지 않았다[7]. 따라서 β -gal과 방향족 알코올과의 반응들은 대부분 입체특이성을 가지나 직쇄상의 지방족 알코올과의 반응성은 입체특이성이 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용한 방향족 알코올인 BzOH의 전환 생성물도 또한 오직 한 종류의 anomer만 특이적으로 관찰되어 모두 일치된 결과를 보이고 있다.



^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.43~7.41 (d, 2H, $J=7.2$ Hz), 7.34~7.30 (t, 2H, $J=7.2$ Hz), 7.28~7.24 (m, 1H), 4.93 (d, 1H, $J=12.0$ Hz), 4.67 (d, 1H, $J=12.0$ Hz), 4.32 (d, 1H, $J=7.6$ Hz), 3.84 (d, 1H, $J=3.2$ Hz), 3.82~3.72 (m, 2H), 3.59 (t, 1H, $J=9.2$ Hz), 3.51 (t, 1H, $J=6.0$ Hz), 3.46 (dd, 1H, $J=10.0$ Hz, $J=3.6$ Hz).

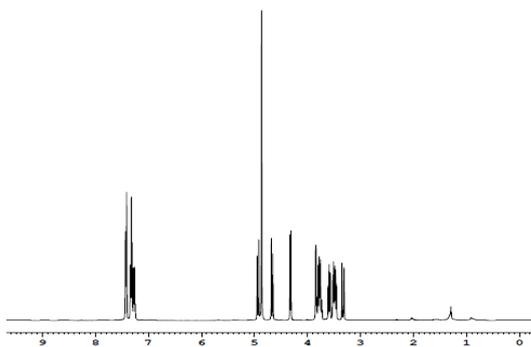


Fig. 1. ^1H -NMR spectrum of BzO-gal.

^{13}C NMR 스펙트럼은 BzO-Gal의 구조에서 기인하는 총 11의 탄소피크가 나타났다(Fig. 2). BzOH의 방향족 탄소로부터 4개의 피크와 벤질 옥시기의 CH_2 1개의 피크, 그리고 당으로부터 6

개의 피크가 δ_{H} 76.9~62.7 ppm 영역에서 나타나 이 물질의 구조는 BzOH에 한 개의 당이 치환된 배당체임을 확인할 수 있었다. ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 139.3, 129.4, 129.3, 128.8, 104.0, 76.9, 75.1, 72.7, 71.8, 70.5, 62.7.

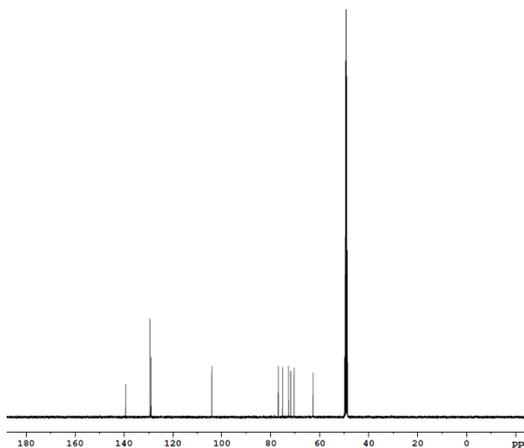


Fig. 2. ^{13}C -NMR spectrum of BzO-gal.

3.2. Mass spectrometry

Fig. 3과 같이 질량분석기 (ESI-MS)를 통해 정제한 BzO-gal 질량을 분석한 결과 293.0994 (m/z)의 peak가 관찰되었다. 이 질량 peak는 다음과 같이 추론 할 수 있었다; [108.14 (BzOH) + 180.156 (galactose) - 18.015 (water) + 22.99 (Na^+) = 293.271] [$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NaO}_6$]. 그래서 이 peak를 BzO-gal의 sodium adduct ion 이라고 확인하였으며, 대장균 β -gal에 의해

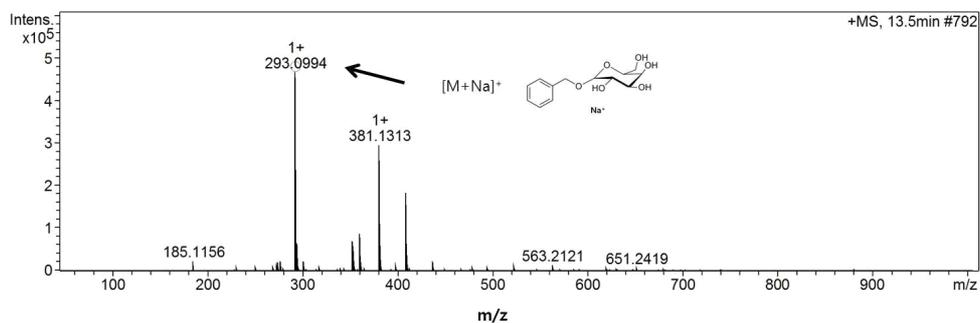
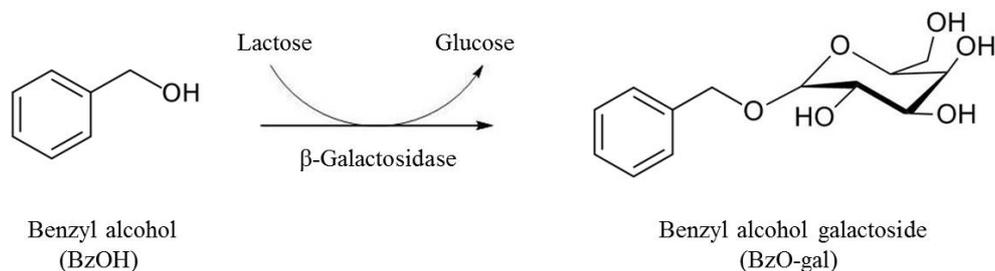


Fig. 3. Mass spectrum of BzO-gal using ESI-MS. Arrow indicates a peak of sodium adduct ion of BzO-gal ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). In addition, molecular structure of $[\text{M}+\text{Na}]^+$ is shown beside the arrow.

Fig. 4. Transgalactosylation reaction of BzOH using β -gal.

transgalactosylation 반응에 의하여 BzO-gal이 합성되었음을 확인할 수 있었다.

4. 결론

대장균 효소인 β -gal을 이용하여 BzO-gal을 합성하기 위하여 transgalactosylation 반응을 수행하였다. 이 때, BzO-gal 합성 추정 물질을 정제한 후, NMR (^1H - and ^{13}C -) spectroscopy와 mass spectrometry 분석을 실시하였다. 그 결과, BzOH의 hydroxyl group (-OH)에 galactose 한 분자를 결합된 BzO-gal의 분자구조와 질량을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 BzOH에서 BzO-gal이 합성되는 transgalactosylation 반응을 Fig. 4와 같이 추론 할 수 있었다. 선행연구에서 합성이 확인된 CPN-gal [3], PE-gal [5], HD-gal [9]와 같이 항균력 변화 없이 피부세포에 대한 독성이 감소된 첨가물 개발을 기대하고 있다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2018년도 맞춤형 기술파트너 지원사업(No. C0652452)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다. 그리고, 한국교통대학교 생명공학과 이해원과 박광숙 학생, (주)제이엔제이푸드 관계자분 들이 본 연구에 도움을 주셨습니다.

References

1. D. Melisi, A. Curcio, E. Luongo, E. Morelli, M. G. Rimoli, "D-Galactose as a vector for prodrug design", *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol.11, No.18, pp. 2288-2298, (2011).
2. H. Devalapally, K. S. Rajan, R. R. Akkinepally, R. K. Devarakonda, "Safety, pharmacokinetics and biodistribution studies of a β -galactoside prodrug of doxorubicin for improvement of tumor selective chemotherapy", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, Vol.34, No.8, pp. 789-795, (2008).
3. S. E. Lee, T. M. Jo, H. Y. Lee, J. Lee, K. -H. Jung, " β -Galactosidase-catalyzed synthesis of galactosyl chlorphenesin and its characterization", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol.171, No.6, pp. 1299-1312, (2013).
4. S. E. Lee, H. Y. Lee, K. -H. Jung, "Production of chlorphenesin galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol.23, No.6, pp. 826-832, (2013).
5. K. -H. Jung, H. Y. Lee, "*Escherichia coli* β -galactosidase-catalyzed synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside and its characterization", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, Vol.38, No.2, pp. 365-372, (2015).

6. H. Y. Lee, K. -H. Jung, "Enzymatic synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.24, No.9, pp. 1254-1259, (2014).
7. Y. -O. Kim, K. -H. Jung, "Enzymatic synthesis of 1, 2-hexandiol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing recombinant *Escherichia coli*", *J. Life Sci.*, Vol.26, No.5, pp. 608-613, (2016).
8. Y. -O. Kim, H. Y. Lee, K. -H. Jung, "NMR spectroscopy and mass spectrometry of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -galactosidase", *J. Korean Oil Chemists' Soc.*, Vol.33, No.2, pp. 286-292, (2016).
9. J. -S. Kim, K. -H. Jung, "Cytotoxic effects of 1, 2-hexanediol and 1, 2-hexanediol galactoside on HaCaT cell", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.44, No.3, pp. 343-347, (2018).
10. Y. -O. Kim, K. -H. Jung, "Water-holding capacity and antimicrobial activity of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized by β -galactosidase", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.43, No.4, pp. 373-379, (2017).
11. S. Sestini, M. Mori, S. Francalanci, "Allergic contact dermatitis from benzyl alcohol in multiple medicaments", *Contact Dermatitis*, Vol.50, No.5, pp. 316-317, (2004).
12. M. Corazza, L. Mantovani, C. Maranini, A. Virgli, "Allergic contact dermatitis from benzyl alcohol", *Contact Dermatitis*, Vol.34, No.1, pp. 74-75, (1996).
13. E. J. Curry, E. M. Warshaw, "Benzyl alcohol allergy: Importance of patch testing with personal products", *Dermatitis*, Vol.16, No.4, pp. 203-208, (2005).
14. E. Shmunis, "Allergic dermatitis to benzyl alcohol in an injectable solution", *Arch. Dermatol.*, Vol.120, No.9, pp. 1200-1201, (1984).
15. K. -H. Jung, "Enhanced enzyme activities of inclusion bodies of recombinant β -galactosidase via the addition of inducer analog after L-arabinose induction in the *araBAD* promoter system of *Escherichia coli*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.18, No.3, pp. 434-442, (2008).
16. K. -H. Jung, "Purifications of phenoxyethanol galactoside and chlorphenesin galactoside using solvent extraction followed by gel chromatography", *J. Oil & Applied Science*, Vol.34, No.4, pp. 954-961, (2017).
17. Y. -O. Kim, K. -H. Jung, " β -Galactosidase-catalyzed synthesis of 1, 2-hexanediol galactoside and its purification using ethyl acetate extraction followed by silica gel chromatography", *J. Korean Oil Chemists' Soc.*, Vol.33 No.3, pp. 498-506, (2016).
18. D. O. Otieno, "Synthesis of β -Galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases", *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, Vol.9, pp. 410-482, (2010).