

*Aspergillus niger*에 의한 Shogaol의 生分解 메카니즘

高 仁 敬·李 相 燮

서울대학교 藥學大學

(Received February 2, 1983)

In Kyung Koh and Sang Sup Lee

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

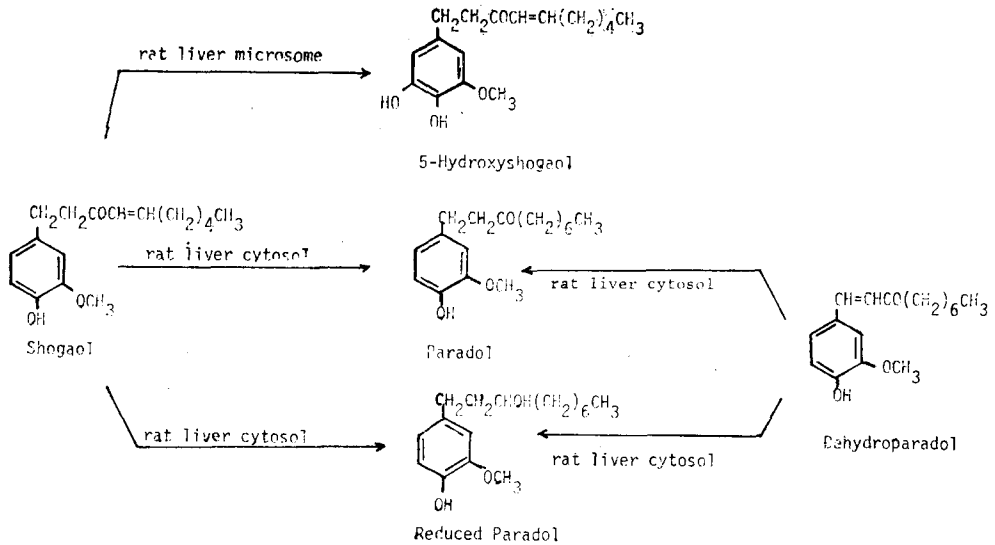
Biodegradation Mechanism of Shogaol by *Aspergillus niger*

Abstract—Shogaol, one of the main pungent principles of the rhizome of *Zingiber officinale*, Roscoe, was biodegraded by *Aspergillus niger* to produce two main metabolites. The crystalline metabolite obtained after silicic acid column chromatography was proved to be 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-10-ol-3-one. The oily metabolite obtained after prolonged fermentation was 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-3, 10-diol. The results suggest that shogaol should be biodegraded to 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-dec-4-en-10-ol-3-one or to 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-3-one, and to 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-10-ol-3-one then to 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-3, 10-diol and finally to carbon dioxide and water.

생강의 신미 성분은 19세기 말 최초로 Thresh에 의해 분리 연구되었고¹⁾ Connell 등은 생강의 주 신미 성분은 *O*-methoxyphenol인 gingerol, shogaol, zingerone 그리고 paradol임을 보고 하였다.^{2,3,4)} 이 성분들의 비율은 생강 원료, 분리 방법, 저장 기간과 저장 방법에 따라 많은 차이를 나타내며 shogaol과 zingerone은 추출과정에서 gingerol이나 oleoresin이 alkali 혹은 열에 의해 변화되어 생성된 분해 산물이다.^{5,6,7)}

동물체내에서 일어날 수 있는 생강의 매운성분류의 대사에 관한 연구는 부분적으로 이루어지고 있다. 흰쥐의 간 microsomal enzyme은 shogaol를 水酸化하여 5-hydroxy shogaol [4^4 -1-(4,5-dihydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone]으로 전환시킬수 있고⁸⁾ 간세포조직의 cytosol fraction 중의 enzyme은 shogaol를 還元하여 paradol과 paradol의 환원체[1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanol]로 전환시킬수 있다.⁹⁾ 또한 paradol 합성중간체인 dehydroparadol 역시 paradol과 paradol의 환원체로 전환될 수 있음이 밝혀졌다.¹⁰⁾ (Scheme I)

한편 방향족 화합물의 미생물에 의한 생분해는 *Pseudomonas* sp.에 의해 side chain은 변화없이 catechol 혹은 protocatechuic acid 등의 대사 중간체를 거쳐 ring이 개열되며 *Nocardia* sp.에서는 acid side chain이 β -oxidation에 의해 대사되고 ring이 개열되기 전에 catechol을 형성함이 보고된 바 있다.^{11,12)} 또한 shogaol과 같은 vanillyl ring moiety를 갖는 고추의 신미 성분인 capsaicin류는 *Aspergillus niger*에 의해 ω -hydroxy capsaicin으로 산화되었다가 다시 더 산화되어 side chain이 분해되는 산화적 생분해 기전이 밝혀져 있다.^{13,14)}



일반적으로 phenol성 물질은 脂質에 대한 抗酸化 效果를 나타낼 수 있다. 생강에서는 gingerol의 抗酸化效果가 檢討되고 있다.¹⁵⁾ 따라서 생강의 매운 성분들은 醱酵食品 중에서도 중요한 기능을 할 것으로 기대된다.

이에 저자는 shogaol을 기질로 사용하여 *Aspergillus niger*에 의한 대사산물을 분리하여 그 構造를 확인함으로써 미생물에 의한 shogaol의 생분해 메카니즘을 설정하여 동물에서의 대사메카니즘과 비교코저 한다.

實驗 方法

機器, 材料 및 試藥—UV spectrum은 실온에서 무수 methanol를 용매로 하여 Hitachi EPS-3T를 사용하였으며, IR spectrum은 시료가 고체인 경우 KBr disk법으로 액체인 경우에는 neat법으로 행하였고 Beckman IR 20A를 사용하였다. NMR spectrum은 $CDCl_3$ 용액 중에서 internal standard로서 TMS(trimethylsilane)를 써서 Perkin-Elmer R 32NMR spectrometer를 사용하였고 chemical shift치는 δ vaue로 표시하였다.

GC-mass spectrum은 시료를 BSTFA[bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide]로 silylation한 뒤 AEI Scientific Apparatus Ltd.의 MS 1073 DBMS 1073를 사용하여 얻었다.

*Aspergillus niger*는 Wisconsin (Madison) 대학의 Dr. C.J. Sih의 제공으로 malt extract agar slants에 보존하였다가 사용하였다.

Malt extract agar slant의 조성은 malt extract(2%), peptone(0.1%), dextrose(2%), agar(2%)이었으며, soybean dextrose medium(S.D.M)의 조성은 NaCl(0.5%), soybean meal(0.5%), K_2HPO_4 (0.5%), dextrose(2%), yeast extract(0.5%), pH5.4(HCl로 조절)이었다.

Shogaol의 제조는 오오히라의 방법을 준용하였다.¹⁶⁾ 즉 vanillin과 acetone을 강한 alkali 존재

하에 처리하여 dehydrozingerone을 합성한 후 다시 3% Na·Hg 처리로 환원하여 zingerone을 얻었다. 이 zingerone에 capron aldehyde를 가하고 40% NaOH로 처리하여 shogaol를 얻었다. 얻은 shogaol은 silica gel chromatography(solvent system: benzene, ethylacetate)를 행하여 정제하였다. Organic 및 inorganic chemicals은 reagent grade을 사용하였고, thin layer chromatograph용 silica gel은 E. Merck Co.의 Kieselgel 60F 254와 Eastmas Co.의 chromatogram sheet을 사용하였다.

전개 용매로는 ethyl acetate(110), isooctane(50), acetic acid(20), H₂O(100)을 진탕 혼합하여 하룻밤 방치후 상등액을 사용하였다. 발색시약으로는 diazotized sulfanilic acid reagent^{17,18)}를 사용하였고, Merck사의 Kieselgel 60(15% Celite 함유)를 써서 gradient elution(ethylacetate: benzene) column chromatography를 행하였다.

實驗方法—소규모 발효는 30°C에서 50ml S.D.M.을 함유한 300ml Erlenmeyer flask를 평판 rotary shaker상에서 180. r.p.m.의 속도로 회전시켜 배양하였으며, 대규모 발효는 소규모 발효와 같은 조건에서 500ml S.D.M.을 함유한 2,000ml Erlenmeyer flask를 사용하여 실시하였다. 총체적인 배양 분석 조작은 Scheme II와 같다.

```

Inoculation of A. niger on S.D.M. (50ml)
  |
  | Incubation on a shaker (180 r.p.m.) at 30°C for 8 hours
  |
  | Transferring to S.D.M. (500ml)
  |
  | Further incubation on a shaker (180 r.p.m.) at 30°C for 24 hour
  |
  | Addition of substrate
  |
  | Further incubation for adequate hours
  |
  | Termination of the fermentation by acidification with c. HCl
  |
  | Extraction with ethylacetate, Evaporation to dryness under reduced pressure
  |
  | Separation by chromatography
  |
  | Acetylation with acetic anhydride and pyridine
  |
  | Analyses with UV, IR, NMR spectroscopy
  
```

Scheme II—Experimental procedure.

1) Shogaol의 소규모 발효 : Malt extract agar slants에 보관된 *A. niger*를 25ml S.D.M.에 접종하여 rotary shaker에서 48시간 preincubation시킨 후 5ml를 pipette로 취해 50ml S.D.M.에 재접종 하였다. 24시간 더 배양시킨 다음 12.5mg의 shogaol을 0.3ml의 N,N-dimethylformamide (D.M.F.)에 녹인 뒤 위의 배양액에 가하였다. 일정시간 간격으로 5ml를 pipette로 취해 HCl을 가해 산성화시켜 배양을 중지하고 5ml ethylacetate로 추출하여 농축하였다. Chromatogram sheet에 각각 점적하여 전개시키고 UV lamp로 흡수 지점을 확인한 후 diazotized sulfanilic acid test로 shogaol의 대사 산물임을 추정하였다. R_f치에 따라 shogaol 대사 산물 1, 2라 정하였다. (Fig. 1)

2) Shogaol 대사산물 1의 분리 : (1) 대규모 발효. Malt extract agar slants에 보존된 *A. niger*를 50ml S.D.M.을 함유한 300ml Erlenmeyer flask 4개에 접종시켜 rotary shaker에서 48시간 배양한 뒤 500ml S.D.M.이 든 2000ml Erlenmeyer flask에 가해 재접종하여 rotary shaker에서 24시간 더 배양하였다. 0.5g의 shogaol을 12ml의 DMF에 녹여 3ml씩 각각의 배양액에 가한 후 33시간 rotary shaker에서 배양한 다음 HCl을 가해 pH 2 되게 하여 배양을 중지 시켰다.

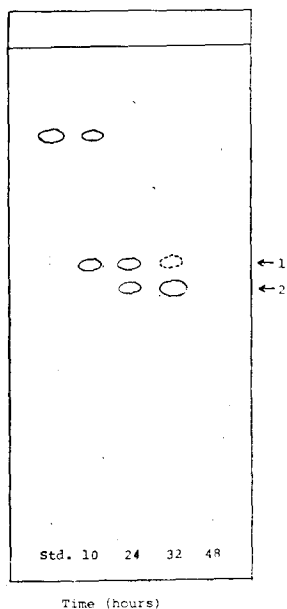


Fig. 1—A TLC profile of shogaol-biodegradation by *A. niger*.

Time: fermentation period, Std: shogaol

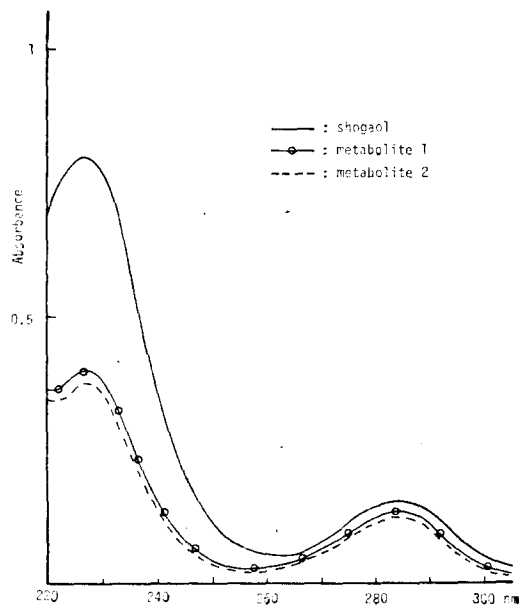


Fig. 2—UV spectra of shogaol, metabolite 1 and metabolite 2.

(2) 추출 및 농축. 배양을 중지시킨 뒤 cheese cloth로 mycelium을 여과하고 여액을 ethyl acetate로 2번 추출하였다. 추출액은 감압, 농축한 뒤 소량의 ethyl ether에 녹여 2N NaOH로 추출하고 HCl을 가해 산성으로 하여 ethyl ether로 재추출 하였다. 추출액은 증류수로 2번 세척하고 Na_2SO_4 로 탈수한 다음 감압, 농축하였다.

(3) 정제. 농축물 0.6g은 silicic acid column(15% celite 함유, $1 \times 30\text{cm}$)을 통해 두번에 나누어 분리하였고 전개 용매 및 전개 방법은 다음과 같은 조성의 gradient elution system으로 하였다. 즉 1st chamber에는 ethylacetate: benzene=20:80 150ml를, 2nd chamber에는 ethylacetate: benzene=70:30 150ml를 넣고 flow rate는 1ml/10min로 하였다.

T.L.C.에서 한점으로 확인된 fraction단 모아 용매를 날려 보내니 30mg의 결정성 물질이 얻어졌다. 이를 UV, IR, NMR, Mass spectroscopy로 구조를 추정했다. (Fig. 2, 3, 4, 8)

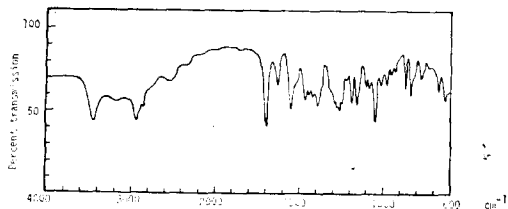


Fig. 3—IR spectrum of metabolite 1.

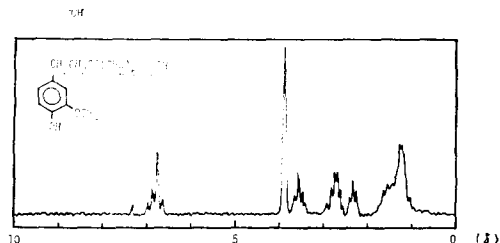


Fig. 4—NMR spectrum of metabolite 1.

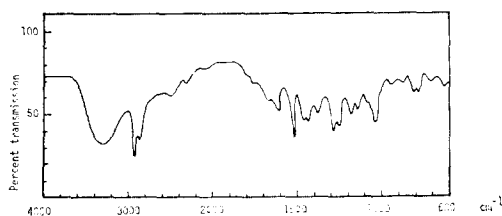


Fig. 5—IR spectrum of metabolite 2.

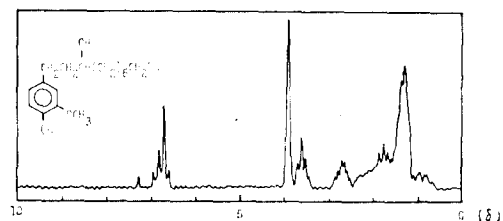


Fig. 6—NMR spectrum of metabolite 2.

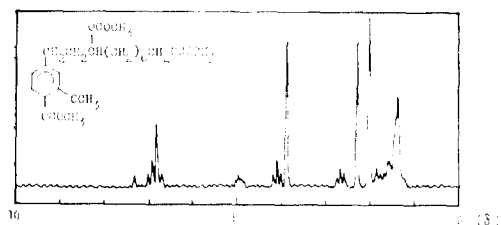


Fig. 7—NMR spectrum of acetylated metabolite 2.

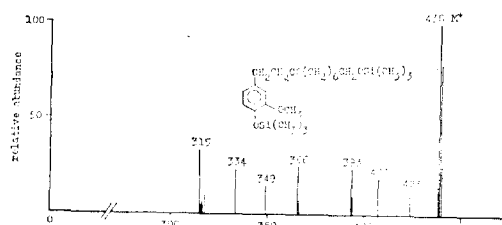


Fig. 8—Mass spectrum of silylated metabolite 1.

3) Shogaol 대사 산물 2의 분리: (1) 대규모 발효, 추출 및 농축. 앞의 나. 와 동일한 조작으로 4개의 2,000ml Erlenmeyer flask에 shogaol 0.5g을 12ml의 D.M.F.에 녹여 3ml씩 각각 가하고 52시간 배양시킨 후 HCl을 가해 배양을 중지시키고 같은 방법으로 추출 농축 하였다.

(2) 정제. 농축물 0.7g을 2)의 (3)에서와 같은 column에 2회에 나누어 분리 하였다. Gradient elution system은 다음과 같다. (1st chamber ethylacetate: benzene=3:7 150ml, 2nd chamber ethylacetate: benzene=8:2 150ml, flow rate: 1ml/10min) T.L.C.에서 한 점으로 확인된 fraction만 모아 용매를 날려 보내고 얻은 50mg의 유상물질을 UV, IR, NMR, Mass spectroscopy로 구조를 추정하였다. (Fig. 2, 5, 6, 9)

(3) Acetylation. 2)에서 분리한 대사 산물 25mg을 취해 소량의 acetic anhydride와 pyridine을 동량 가해 하룻밤 실온에서 방치하여 acetylation시켰다. 용매를 날려 보내고 얻어진 물질을 NMR spectroscopy로 구조를 추정했다. (Fig. 7)

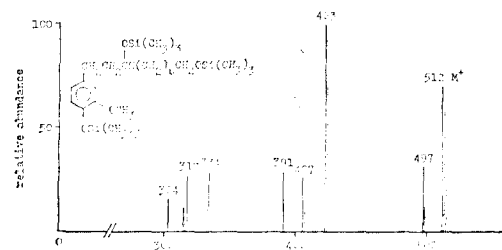


Fig. 9—Mass spectrum of silylated metabolite 2.

實驗結果 및 考察

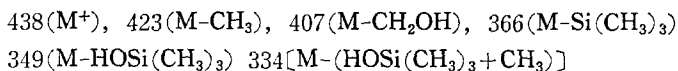
Shogaol은 구조상으로 볼때 미생물에 의해 대사가 가능한 부위가 세곳이 있다. 첫째, shogaol의 vanillyl ring moiety로서 이곳이 산화를 받아 catechol 중간체로 되었다가 더욱 산화되어 ring이 깨어져 분해되는 것이고, 둘째 shogaol의 side chain 말단으로서 ω -oxidation되어 지방산 분해에서 일반적인 β -oxidation을 거쳐 분해되는 것이며, 셋째 shogaol의 side chain의 α, β -unsaturated ketone 부위의 환원이다. electronegative substituent가 없는 conjugated carbonyl system이 미생물에 노출시는 이중 결합의 환원이 carbonyl의 환원을 우선한다.¹⁹⁾

小規模 醱酵—Shogaol의 미생물 전환 기전을 알기 위해 shogaol을 250ng/ml의 농도로 *A. niger*에 노출시켰을 때 2가지 대사 산물이 각각 축적되었으며 각 대사 산물은 UV lamp에 흡수를 나타내고 diazotized sulfanilic acid test에서 양성을 나타내어 phenol성 물질임을 알 수 있었다.

大規模 醱酵—UV spectrum상의 shogaol의 227nm에서의 λ_{max} 는 side chain의 α, β unsaturated ketone과 vanillyl ring moiety에 기인하며 282nm의 λ_{max} 는 vanillyl ring moiety에 기인한다. 대 규모 발효로 얻은 대사 산물들의 UV spectrum을 측정시 282nm에서의 absorbance의 강도를 표준품의 강도와 동일하게 하였을 때 227nm의 absorbance가 shogaol에 비해 현저히 저하됨으로 ring 쪽은 그대로이며 side chain에 변화가 일어 났음을 시사해 주었다. (Fig. 2)

1) 代謝產物 1: Shogaol은 IR spectrum상에서 α, β unsaturated ketone의 C=O peak가 1670cm^{-1} 과 1630cm^{-1} 에서 나타나나 대사산물 1의 IR spectrum에서는 1700cm^{-1} 에서 강한 peak가 나타남으로써 독립된 ketone으로 변화되었음을 알 수 있었다.

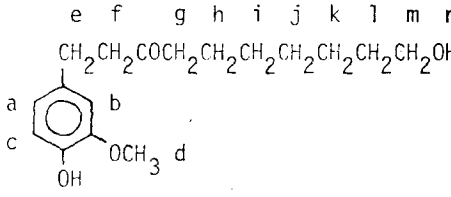
대사산물 1의 NMR spectrum에서는 shogaol의 carbonyl에 인접한 불포화 수소들의 5.2ppm과 5.9ppm에서의 peak와 side chain 말단의 CH_3 의 0.85ppm에서의 peak가 사라지고 2.37ppm과 3.64ppm에서 새로운 peak가 나타났다. (Fig. 4) 대사산물 1의 NMR signal은 Table I에 설명되어 있으며 mass fragmentation은 다음과 같다.



이상의 spectrum상의 결과로 보아 대사산물 1은 shogaol의 side chain의 ω 위치가 수산화되고 α, β unsaturated ketone이 포화 ketone으로 환원된 1-(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-decan-10-ol-3-one으로 사료된다.

2) 대사 산물 2: 먼저 대사 산물 2의 IR spectrum에서 1700cm^{-1} 부근의 흡수가 사라짐으로 C=O의 부재를 알 수 있었다. (Fig. 5)

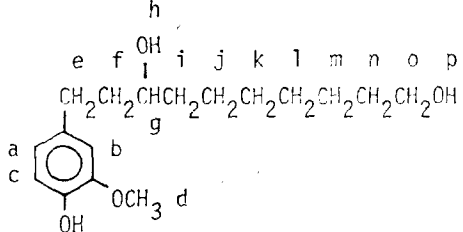
Table I—NMR spectral data for metabolite 1.



Chemical shift (δ)	No. of H	Pattern	Assignment
6.76	3	quartet	a, b, c
3.88	3	singlet	d
3.64	2	triplet	m
2.76	4	sextet	e, f
2.37	2	triplet	g
Ca 2.3	1	buried	n
1.1~1.8	10	multiplet	h-1

Solvent: CDCl_3 , Internal standard: TMS

Table II—NMR spectrum of metabolite 2.



Chemical shift (δ)	No. of H	Pattern	Assignment
6.78	3	quartet	a, b, c
3.9	3	singlet	d
3.67	3	triplet	o
2.7	2	multiplet	e
Ca 2.3	1	buried	p
1.2~2	16	multiplet	f-n

Solvent: CDCl_3 , Internal standard: TMS

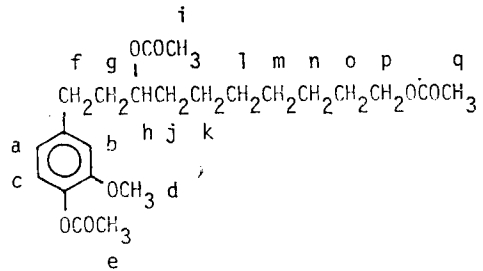
대사 산물 2의 NMR signal은 Table II에 설명되어 있으며 mass fragmentation은 다음과 같다.

- 512(M⁺), 497(M-CH₃),
 423(M-HOSi(CH₃)₃),
 407[M-(Si(CH₃)₃+CH₂OH)]
 334(M-2×OSi(CH₃)₃),
 303[M-(2×HOSi(CH₃)₃+CH₂OH)]

대사 산물 2의 구조를 더욱 명확히 하기 위해 acetylation한 대사산물 2의 2.04ppm에서의 acetyl기의 6개의 수소 peak로 원래 phenol성 OH기 이외에 두 곳이 수산화 되었음을 추정하였고(Table III), 이상의 결과로 대사 산물 2는 대사 산물 1의 carbonyl이 환원된 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-3, 10-diol임을 규명하였다.

Shogaol의 대사산물 1로의 전환은 산화와 환원의 두단계 반응인데 이 중 어느 반응이 먼저 혹은 동시에 일어나는 지에 대해서는 확실히 규명하지 못하였고 대사산물 2에서 더욱 산화되어 지방산의 β-oxidation을 거쳐 분해될 것으로 예측되나 앞의 (Fig. 1)에서 본 바와 같이 48시간 이후에는 대사 산물이 검출되지 않음은 대사 속도가 빠르기 때문인 것으로 사료 된다.

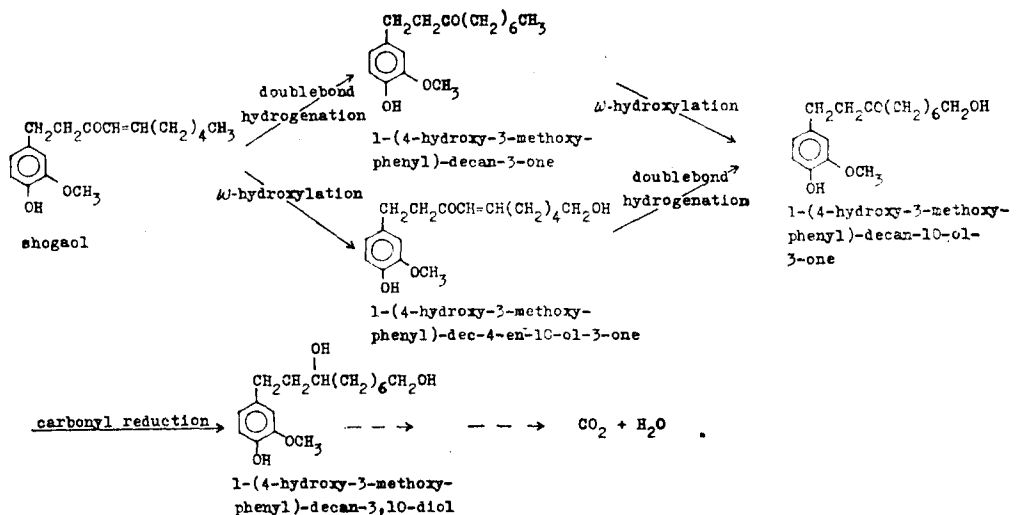
Table III—NMR spectrum of acetylated metabolite 2.



Chemical shift (δ)	No. of H	Pattern	Assignment
6.86	3	quartet	a, b, c
4.97	1	broad	h
4.08	2	triplet	p
3.84	3	triplet	d
2.63	2	triplet	f
2.29	3	singlet	e
2.04	6	singlet	i, q
1.2~1.9	14	multiplet	g, j~o

Solvent: CDCl₃, Internal standard: TMS

48시간 이후에는 대사 산물이 검출되지 않음은



Scheme III—Biodegradation pathway of shogaol by *A. niger*.

結 論

Shogaol을 *A. niger*에 접촉시켰을 때 생전환(biotransformation)이 이루어져서 축적되는 대사 산물을 분리 확인한 결과 대사 산물 1은 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-decan-10-ol-3-one이며 대사 산물 2는 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3, 10-diol이라고 믿어진다.

대사 산물 1과 2를 얻는 과정에서 얻은 지견을 감안하여 볼때 *A. niger*에 의한 shogaol의 생분해(biodegradation)의 초기 단계의 기전은 다음과 같은 경로가 있는 것으로 믿는다. (Scheme III)

文 獻

1. J.C. Thresh. *Pharm. J.*, **10**, 721 (1879); **12**, 243 (1881), **14**, 798 (1883); **15**, 208 (1884).
2. D.W. Connell and M.D. Sutherland *Aust. J. Chem.*, **22**, 1033 (1969).
3. E.K. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, 1466 (1917).
4. H.D. Locksley, D.K. Rainey, *J. Chem. Soc. Perkin I.*, **23**, 3001 (1972).
5. D.W. Connell and R. McLachlan, *J. Chromatography*, **67**, 29 (1972).
6. S. Narasimhan and V.S. Govindarajan, *J. Food Technol.*, **13**, 31 (1978).
7. J.E. Knapp, D.J. Slatkin and P.L. Schiff, Jr., *Phytochem.*, **14**, 853 (1975).
8. S.S. Lee, and S. Kumar, *Microsomes, Drug Oxidations, and Drug Toxicity*, edited by Sato, R and Kato, R. p.569. Japan Scientific Societies Press (Tokyo) and Wiley-Interscience (New York) (1982).
9. Y. J. Surh, *M.S. Thesis*. Seoul National University (1982).
10. Y. J. Oh, *M.S. Thesis*, Seoul National University (1981).
11. S. Dagley, W.C. Evans, and D.W. Ribbons, *Nature* **188**, 560 (1960).
12. D.T. Gibson, *Science*, **161**, 1093 (1968).
13. S.S. Lee, and I.S. You, *Korean Biochem. J.* **10**, 135 (1977).
14. S.S. Lee, Y.H. Baek, S.Y. Ko, and S. Kumar *Proceedings of 1st. Int. conference on chemistry and biotechnology of biologically active natural products*, **3**, 189-193, Varna Bulgaria (1981).
15. I.K. Lee, *M.S. Thesis*, Seoul National University (1982).
16. H. Nomura, and J. Tzurumi, *Proc. Imp. Acad.* **3**, 159 (1927).
17. R.C. Baldrige, and H.B. Lewis, *J. Biol. Chem.*, **202**, 169 (1973).
18. E. Stahl, *Thin Layer Chromatography* (1973).
19. J.B. Jones, C.J. Sih, and D. Pearlman, *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry Part I.* 69 (1976).