

## Glucose를 비타민 C로 변형시키는 과정의 최적화에 대한 연구

정 중 경 · 구 양 모 · 김 공 환\*

서울대학교 약학과 · 아주대학교 생물공학과\*

(Received November 4, 1988)

### Optimization of the Transformation of D-Glucose to Vitamin C

Jong-Kyeong Chung, Yang Mo Goo and Kong-Hwan Kim\*

Department of Pharmacy, Seoul National University Seoul, Korea and

\*Department of Biotechnology, Ajou University Suwan, Korea.

**Abstract**—Chemical transformation of D-glucose to 2-keto-L-gulonic acid and L-ascorbic acid has been examined. D-Sorbitol obtained from D-glucose was microbiologically oxidized to L-sorbose by *G. suboxydans* in 90% yield. On treatment of L-sorbose with acetone in the presence of sulfuric acid, its diacetonide is obtained in 95% yield. This diacetonide is oxidized to the corresponding acid with nickel chloride-hypochlorite, and the acid is directly transformed to L-ascorbic acid. The over all yield of Vitamin C from D-glucose achieved is 54%.

포도당은 L-ascorbic acid로 변형시킬 수 있는 출발물질로서 가장 값싸고 구조적으로도 유리한 입체구조를 갖고 있어서 포도당을 L-ascorbic acid로 변형시키는 과정에 대해서 많은 연구가 수행되었다.<sup>1)</sup>

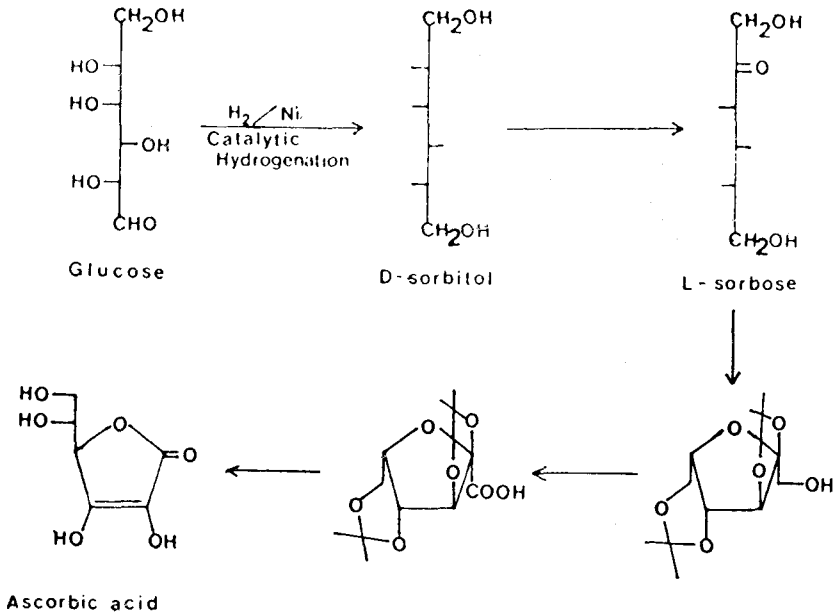
포도당의 알데히드기를 환원시켜주고 C-5와 C-6기의 hydroxyl기를 각각 ketone기와 산기로 산화시켜주면 2-keto-L-gulonic acid로 변형될 수 있고 이 산기를 락톤화하면 L-ascorbic acid가 생성된다(Scheme 1).

현재 공업적인 L-ascorbic acid의 생성은 D-glucose를 sorbitol로 환원시키고 이 sorbitol을 *G. suboxydans*를 이용하여 L-sorbose로 산화시킨 후에 L-sorbose의 C-1 위치의 알콜을 산으로 산화시키고 락톤화하여 이루고 있다. L-sorbose의 C-1 위치의 알콜을 산으로 산화시키는 과정은 L-sorbose의 다른 수산기를 diacetonide 형태로 보호시켜 2,3;4,6-di-O-isopropylidene-L-xylo-2-hexulofuranose로 만든후에 과망간산칼리를 사용하여 이룬다. 이때 얻어지는 2-keto-L-gulonic acid diacetonide(2,3;4,6-di-O-isopropylidene-L-

xylo-2-hexulofuranosonic acid)을 가수분해하여 2-keto-L-gulonic acid(L-xylo-2-hexulosonic acid)을 얻고 이것을 산촉매 하에서 락톤화하여 L-ascorbic acid를 얻고 있다. Reichstein 등이 개발한<sup>2)</sup> 이 단계들은 공업적으로 실용화 과정을 거치면서 각 반응단계에 대하여 치밀한 연구가 행해져 왔는데 그 연구결과들은 대부분이 비밀로 되어 있고 매년 수많은 연구결과들이 특허로 나오고 있다.<sup>3)</sup>

이 단계들중에서 D-sorbitol은 *Gluconobacter* sp.들을 이용하여 L-sorbose로 전환시키고 있다.<sup>4-6)</sup> L-sorbose를 L-sorbose diacetonide로 만드는 단계에 대해서는 수율을 90% 이상 증대시키는 반응조건과 반응용매에 관련된 연구들이 아직까지 끊임없이 보고되고 있고, 또한 부반응물로 생성되는 monoacetonide들을 재사용하여 L-sorbose diacetonide로 변형시키는 방법들이 특허로 출원되고 있다.<sup>6)</sup>

2,3;4,6-L-sorbose diacetonide의 C-1 위치의 수산기는 화학적인 방법 또는 전기화학적인 방법으로 카르복시산으로 산화시킬 수 있는데, 공



업적으로는 화학적인 방법인  $\text{NiCl}_2$  촉매하에서 hypochlorite를 사용하여 산화시키고 있다.

Reichstein 등은 2-keto-L-gulonic acid의 2, 3; 4, 6-diacetonide를 세단계를 거쳐서 L-ascorbic acid로 전환하였으나 최근에는 한 단계 반응에 의하여서도 가능한 것으로 보고되었다.<sup>4-8)</sup> 현재 포도당 2kg으로부터 순수한 L-ascorbic acid를 1kg까지 얻고 있다. 본 논문에서는 포도당을 Reichstein방법에 따라서 비타민 C로 변형시키는 각 단계에 대하여 보고된 공업적인 과정을 재조사 하였고 각 단계의 수득율을 극대화시키는 최적화 과정을 연구하였다.

### 실 험 방 법

**실험일반**— $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼과  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼은 TMS를 기준물질로 하여 또는 1, 4-dioxane의 피크를 TMS에 대하여 67.4ppm으로 잡아서 Bruker 80MHz 또는 300MHz, 또는 Varian 200 MHz NMR spectrophotometer를 사용하여 구하였으며 chemical shift는 ppm 단위로 보고하였다.

IR 스펙트럼은 Beckman IR-20-A를 사용하여

서 얻었으며 선광도는 Jasco DIP-360 digital polarimeter와 Schmidt Hansen polarimeter를 사용하여 구하였다. 자외선 흡광도는 LKB ultrapec 4050을 사용하여 구하였다. 종이크로마토그래피에는 Whatman No. 1 종이를 사용하였으며, 박막크로마토그래피(TLC)에는 실리카겔 판(0.25 mm, 유리판, Riedel-DeHaen Aktiengesellschaft Seelze-Hannover)을 사용하였다. 사용한 마이크로피펫은 Micropet Disposable Pipettes(정확도: 0.25%, Clay Adams)이다. 용점은 Gallenkamp Melting Point Apparatus를 사용해서 측정하였으나 보정하지 않았다. 실험에 사용한 균주는 Institute of Fermentation in Osaka(IFO)로부터 냉동건조된 상태로 구입하였다. 사용한 모든 시약과 용매는 1급품으로 이들을 구입한 그대로 사용하였다.

**균주보관**—*G. suboxydans*은 Mannitol-아가 (0.5g yeast extract, 0.3g peptone, 2.5gmannitol, 1.5g아가, 100ml 증류수) 사면배지에 배양하여 두고 사용하였다.

**D-Sorbitol의 L-sorbose로의 전환**—5g의 D-sorbitol과 0.21g의 yeast extract를 46ml의 증류수에 잘 녹인 후 멸균하고 *G. suboxydans*(IFO

3172)를 접종하고 배양하였다. 균을 배양하면서 일정한 시간마다 멸균된 피펫으로 배양액을 1ml씩 취해서 증류수 3ml로 희석한 후에 610nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 균의 성장도를 구하였다. 균을 원심분리하여 제거한 후에 배양액의 선광도변화를 측정하였다. 또 배양액을 종이(25×5cm) 위에 점적하여 전개하고(전개용매: 물을 포화시킨 phenol용액) 전개한 종이를 과망간산칼리용액(0.5% NaOH용액)을 분무하여 D-sorbitol과 L-sorbose의 반점을 확인했다. 192시간 배양한 후에 배양액을 여과하였다. 여과액을 감압증발시키어 4.72g의 노랑색 결정의 sorbose를 얻었다(수득률: 94%); mp. 163~165°C(보고된 mp.<sup>11)</sup> 165°C); <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼: 62.6, 64.4, 70.2, 71.3, 74.4, 98.5ppm.

**L-Sorbose Diacetonide**의 합성—공업용 아세톤 2l를 삼각플라스크에 담고 과망간산칼리 3g을 넣은 후 3일간 방치한 후에 증류하여 56~58°C에서 나오는 분액 1.9l를 활성화시킨 4A molecular sieve를 250ml 넣어준 뒤 외부와 차단하여 2일간 방치한 후에 사용하였다. 250ml 둥근 바닥 플라스크에 magnetic bar와 L-sorbose 9.0g(0.05mole)을 재어넣고 플라스크를 밀폐하였다. 탈수된 아세톤 109ml(30당량)를 넣어준 뒤 플라스크를 얼음수조에 냉각하였다.

아세톤용액을 교반하면서 차가운 98% 황산 3.12ml(1.2eq.)를 10분에 걸쳐서 서서히 점적하였다. 용액을 30분간 얼음수조에서 그리고 두시간 동안 상온에서 교반하였다. L-sorbose가 완전히 용해하여 투명한 연두색이 된 용액에 가성소다 가루(2.4g, 1.2eq.)를 몇번으로 나누어 가하여 준 후에 pH값이 7~8이 될 때까지 5~6시간 교반하여 주었다. Acetone용액을 여과한 후에 증발시켜 연노랑색의 유상물질을 얻었다. 이 유상물질을 증류수 8ml에 녹이고 CHCl<sub>3</sub>(80ml)를 사용하여 3회 추출하였다. CHCl<sub>3</sub> 추출액을 농축하면 sorbose의 2,3;4,6-diacetonide(O<sup>2</sup>, O<sup>3</sup>; O<sup>4</sup>, O<sup>6</sup>-diisopropylidene- $\alpha$ -L-sorbofuranose)가 무색의 유상물질로 얻어지는데 서서히 침상결정으로 변했다. 11.6g(수득률: 89%); R<sub>f</sub>=0.74(silica gel, CHCl<sub>3</sub>-acetone=7:3); mp.: 73~76°C(보고된

용점<sup>12)</sup>: 77.5~78°C); <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) 스펙트럼: 1.36(s, 6H), 1.44(s, 3H), 1.51(s, 3H), 2.52(s, 1H, C<sub>1</sub>-OH), 3.84(d, 1H, J=12Hz, C<sub>6</sub>-H), 3.91(d, 1H, J=12Hz, C<sub>6</sub>-H), 4.07(d, 1H, J=14.3Hz, C<sub>1</sub>-H), 4.08(d, 1H, J=14.3Hz, C<sub>1</sub>-H), 4.11(d, 1H, J=1.6Hz, C<sub>3</sub>-H), 4.34(d, 1H, J=1.6Hz, C<sub>4</sub>-H), 4.49ppm(s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>) 스펙트럼: 18.5, 26.4, 27.2, 28.7, 60.1, 63.4, 72.1, 73.2, 84.7, 97.3, 111.7, 114.3ppm. L-sorbose diacetonide를 분리하고 남았던 수층을 감압농축하여 600mg의 유상물질을 얻었다. Silica gel(70~240 mesh, 25g, Merck Co.)로 충전한 칼럼(2.5×15cm)에 이 물질을 크로마토그래피(CHCl<sub>3</sub>-아세톤=7:3) 하여 L-sorbose 2,3-acetonide(O<sup>2</sup>, O<sup>3</sup>-isopropylidene- $\alpha$ -L-sorbofuranose, silica gel TLC R<sub>f</sub>=0.16, 전개용매: CHCl<sub>3</sub>-아세톤=7:3) 420mg과 L-sorbose 1,2-acetonide(O<sup>2</sup>, O<sup>3</sup>-isopropylidene- $\alpha$ -L-sorbofuranose, silica gel TLC R<sub>f</sub>=0.07, 전개용매: CHCl<sub>3</sub>-아세톤=7:3) 120mg을 얻었다.

O<sup>2</sup>, O<sup>3</sup>-isopropylidene- $\alpha$ -L-sorbofuranose: <sup>1</sup>H-NMR(아세톤-d<sub>6</sub>) 스펙트럼: 1.33(s, 3H), 1.44(s, 3H), 3.69(d, 2H, J=5.8Hz, C<sub>1</sub>-H), 3.80(m, 2H, C<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>), 4.01(t, 1H, J=5.8Hz, C<sub>1</sub>-OH), 4.12(dd, 1H, J=7.3Hz, J=2.4Hz, C<sub>4</sub>-H), 4.26(dt, 1H, J=5.6Hz, J=2.4Hz, C<sub>5</sub>-H), 4.41(s, 1H, C<sub>4</sub>-OH), 4.43(d, 1H, J=7.3Hz, C<sub>3</sub>-H), 4.59ppm.(t, 1H, 7.0Hz, C<sub>6</sub>-OH); <sup>13</sup>C-NMR(아세톤-d<sub>6</sub>) 스펙트럼: 25.9, 26.6, 60.0, 63.0, 74.6, 82.0, 85.9, 111.4, 114.0 ppm.

O<sup>1</sup>, O<sup>2</sup>-disopropylidene- $\alpha$ -L-sorbofuranose: mp. 137~140°C(분해됨); <sup>1</sup>H-NMR(아세톤-d<sub>6</sub>) 스펙트럼: 1.36(s, 3H), 1.43(s, 3H), 3.25(t, 1H, J=8.0Hz, C<sub>6</sub>-OH), 3.54(bs, 2H, C<sub>3</sub>-OH and C<sub>4</sub>-OH), 3.54(q, 1H, J=8.0Hz, C<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>), 3.75(d, 1H, J=8.0Hz, C<sub>5</sub>-H), 3.81(d, 1H, H=8.2 Hz, C<sub>4</sub>-H), 4.11(q, 2H, J=3.4Hz, C<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>), 4.12ppm(d, 1H, J=8.2Hz, C<sub>3</sub>-H); <sup>13</sup>C-NMR(아세톤-d<sub>6</sub>) 스펙트럼: 26.4, 26.6, 64.0, 71.0, 72.0, 72.4, 76.7, 106.5, 112.2ppm.

**L-Sorbose Diacetonide** 합성에 있어서 황산량의 변화에 따른 변화—L-sorbose의 양에 대해서 황산을 3당량, 1당량, 0.5당량을 각각 사용하여 반응을 한 후에 동일한 당량의 NaOH 펠렛으로 중화하고 반응액을 TLC(실리카겔, 전개용매:  $\text{CHCl}_3$ -아세톤=7:3)하여 L-sorbose diacetonide의 생성효율도를 구하였다.

아세톤양의 변화에 따른 **L-sorbose diacetonide** 생성의 변화—L-sorbose에 대해서 황산량을 1당량 사용하고 아세톤은 각각 10당량, 15당량, 30당량을 사용하여서 같은 방법으로 반응을 시킨 후에 사용한 황산량에 대해서 1.2당량의 NaOH 펠렛을 가해서 중화시키고 생성된 물질을 TLC(실리카겔, 전개용매:  $\text{CHCl}_3$ -아세톤=7:3, 발색: 50% 황산-메탄올 용액)로 확인했다.

**ZnCl<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>**법을 이용한 **L-sorbose diacetonide**의 합성—ZnCl<sub>2</sub>를 둥근 바닥 플라스크에 넣고 감압흡인하면서 불꽃으로 플라스크를 가열하여 주어 완전히 말렸다. L-sorbose(500mg)와 ZnCl<sub>2</sub>(510mg)에 3.5ml의 탈수 아세톤을 가하고서 85% 인산을 주사기로 3방울을 적하한 후에 교반하였다. 75시간 후에 NaOH 펠렛을 반응액에 넣고서 교반하여 반응액의 pH가 7~8이 되면 반응액을 실리카겔 TLC 분석하여 반응의 결과를 확인하였다.

**L-Sorbose diacetonide**의 **2-keto-L-gulonic acid diacetonide**로의 산화—L-sorbose diacetonide 1g을 1N NaOH 수용액(8.4ml)에 녹인 후에 56°C 항온수조에 담구고 교반하면서 NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O(40mg)를 넣었다. 그리고 antiformin(12ml)를 가하여 준 후에 30분간 교반한 후에 반응용액을 감압여과하여 맑은 연황색의 수용액을 얻었다. 감압하에서 이 수용액을 5ml로 농축한 후에 얼음수조에서 냉각시키었다. 차가운 35% HCl용액 0.65ml를 이 용액에 점적하여 주어 0.74g(수득율: 73%)의 2-keto-L-gulonic acid diacetonide(2, 3; 4, 6-di-O-isopropylidene-2-keto-L-gulonic acid monohydrate)를 얻었다. mp. 85~87°C(보고된 mp.<sup>14)</sup> 88~90°C), R<sub>f</sub>=0.58(실리카겔 TLC, 전개용매: n-propanol-물

=4:1); <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>) 스펙트럼, 1.38(s, 3H), 1.47(s, 3H), 1.53(s, 3H), 1.56(s, 3H), 4.14(s, 2H, C<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>), 4.25(d, 1H, J=2Hz, C<sub>5</sub>-H), 4.41(d, 1H, J=2Hz, C<sub>4</sub>-H), 4.63(s, 1H, C<sub>3</sub>-H); <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>) 스펙트럼: 18.6, 25.5, 26.7, 28.8, 59.8, 72.3, 74.4, 88.2, 98.2, 109.2, 115.7, 167.8ppm.

**2-Keto-L-Gulonic Acid Diacetonide**를 **L-Ascorbic Acid**로의 변형—2-Keto-L-gulonic acid diacetonide 45mg을 5ml 둥근 바닥 플라스크에 넣고  $\text{CHCl}_3$  1ml를 가하여 녹인 후, 35% HCl용액 0.02ml를 피펫으로 취하여서 넣고 65°C의 항온수조에서 48시간 교반하였다. 감압하에서 반응액의 용매를 날려보내면 얻어지는 유상 물질인 L-ascorbic acid는 서서히 둥그란 판상의 결정으로 변화되었다(수득량: 29mg), mp.: 190~191°C(decomposed; 보고된 mp.<sup>11)</sup> 193°C, decomposed).

## 실험결과 및 고찰

**G. suboxydans**를 이용하여 **D-sorbitol**을 **L-sorbose**로 산화—**G. suboxydans**의 성장곡선과 선평도 변화곡선이 Fig. 1에 주어지 있다. 이 성장곡선을 살펴보면 136시간에 달하면 균의 성장이 stationary phase에 달하는 것을 알 수 있고 D-sorbitol의 L-sorbose로 산화반응이 181시간까지 일어난다는 것을 선평도 변화곡선에서 알 수 있다.

배양액에서 생성된 L-sorbose의 양을 계산하기 위해 기지의 농도비율을 가진 D-sorbitol과 L-sorbose의 혼합용액을 사용하여서 선평도를 측정하여서 그래프를 작성하여서 69, 87, 136 그리고 181시간 동안 **G. suboxydans**를 배양한 후에 배양액의 선평도 측정값에서 부터 그때 배양액에 존재하는 L-sorbose의 함량을 계산하여 D-sorbitol이 L-sorbose로 산화된 비율(L-sorbose의 생성율 %)를 구하였다. 이 결과에서 보면 192시간 배양 후에 D-sorbitol이 L-sorbose로 완전히 전환되었을 것으로 생각되어서 TLC를 해본 결과 황산용액에 대해서 흑갈색으로 발색되는 L-

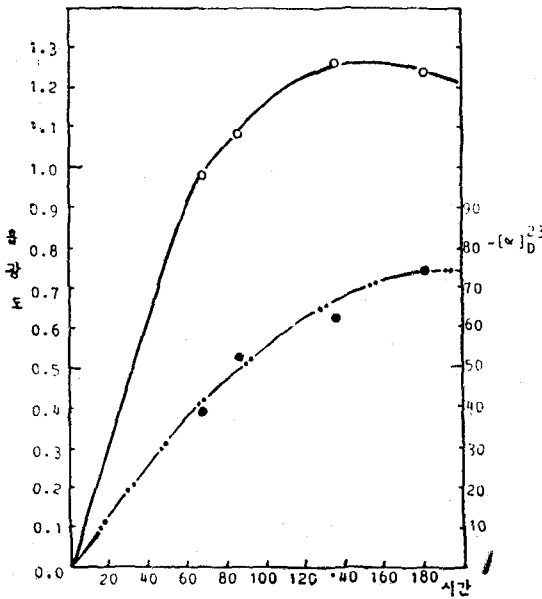


Fig. 1—Growth(○—) and transformation(●— · —) Sorbitol to Sorbose by *Gluconobacter Suboxydans*

sorbose( $R_f=0.13$ )가 뚜렷이 나타났으며,  $KMnO_4$  용액에 발색되는 D-sorbitol( $R_f=0.18$ )은 완전히 소모된 것으로 확인되었다. 얻어진 결정으로 용점을 측정하여 본 결과, 그리고  $^{13}C$ -NMR 스펙트럼을 표준품과 비교하여 본 결과 결정이 L-sorbose임을 확인하였다. 본 실험에서 배양액에 10%의 D-sorbitol을 배양 플라스크에 3회에 나누어서 넣어줌으로서 20% D-sorbitol 농도까지 무리없이 반응시킬 수 있었다.

**L-Sorbose Diacetonide의 합성**—L-Sorbose를 아세톤과 반응시켜 L-sorbose diacetonide를 합성하는 단계는 황산,  $ZnCl_2$ -인산 또는  $CuSO_4$ 를 촉매로 사용하여서 반응의 효율도를 조사하였다.

$CuSO_4$ 를 촉매로 sorbose를 acetonide화시키면  $O^1, O^2$ -isopropylidene- $\alpha$ -L-sorbopyranose가 주 반응물로 얻어지고  $O^2, O^3; O^4, O^6$ -diisopropylidene- $\alpha$ -sorbofuranose가 부반응물로 얻어짐이 보고되었다.<sup>15)</sup> 또한  $O^1, O^3; O^4, O^6$ -diisopropylidene- $\beta$ -L-sorbofuranose가 미량으로 생성되는 것이 보고되었다.<sup>14)</sup>

$H_2SO_4$ 를 사용한 sorbose의 diacetonide합성은 반응조건에 따라 monoacetonide와 diacetonide

의 혼합물이 항상 생겨나는 것으로 알려져 있다.<sup>14)</sup> 또한 초기의 sorbose를 acetone용액에서  $H_2SO_4$ 의 촉매하에 반응시킨 후에 수용성 NaOH로 중화시켜  $O^2, O^3; O^4, O^6$ -diisopropylidene- $\alpha$ -L-sorbofuranose를 주 생성물로 얻고  $O^2, O^3$ -isopropylidene-L-sorbofuranose를 부 생성물로 그리고 미량의  $O^1, O^2$ -isopropylidene- $\alpha$ -L-sorbopyranose를 얻은 것으로 보고되었다.<sup>14)</sup>

최근에도 황산을 촉매로 사용하여 L-sorbose의 diacetonide를 효율적으로 얻은 방법에 대한 연구가 특히로 계속되고 있고, 또 부반응물로 생성되는 monoacetonide를 재반응시켜 diacetonide로 변형시키는 recycle의 방법이 특히로 보고되고 있다. 최근에  $ZnCl_2$ -인산을 촉매로 사용한 L-sorbose의 diacetonide합성이 보고되어 있어 이 방법을 재 조사하여 본 결과 L-sorbose diacetonide가 50% 이하의 수득율로 생성된 반면 여러 부산물들이 생성되었으며, 유색 물질도 생성되었다.

황산을 촉매로 사용하여 L-sorbose diacetonide를 형성시키는 반응은 포도당에서부터 L-ascorbic acid를 얻는 Reichstein 등의 방법에서 가장 중요한 단계로 다른 촉매를 사용하는 경우에도 원하는 L-sorbose diacetonide가 효율적으로 얻어지지 않을 것으로 생각된다.

이 반응은 L-sorbose의 acetonide형태와 L-sorbose가 상호평형을 이루면서 생성되는 반응으로 acetonide를 형성할 때 발생하는 물을 농축산이 흡수하여 줌으로써 acetonide의 형성쪽으로 반응이 기울어질 것으로 생각된다. 실제로 탈수하지 않은 아세톤을 사용한 경우에는 diacetonide의 생성율이 50% 이하로 저하되었다.

황산과 함께 아세톤에 L-sorbose를 넣고 교반하여 주된 반응이 진행되면서 L-sorbose가 아세톤에 완전히 용해된다. 이때 L-sorbose는 아세톤-황산용액에 거의 불용인 반면 이 화합물의 monoacetonide와 diacetonide는 아세톤에 잘 녹으므로, L-sorbose acetonide가 생성되면서 L-sorbose가 아세톤에 녹아 들어간다고 가정하면 L-sorbose acetonide의 생성 반응계는 L-sorbose의 diacetonide와 monoacetonide 사이에 일정한

한 평형상태를 이룰 것으로 생각된다. 이때 monoacetonide가 L-sorbose로 다시 전환되는 것은 무시할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 L-sorbose가 완전히 녹아들어가서 반응액이 맑은 용액상으로 바뀌었을 때는 monoacetonide들과 diacetonide가 일정한 비율로 반응액 중에서 확인될 것으로 생각했었는데 실제 반응에서는 중화를 하기 전, 즉 L-sorbose가 완전히 녹은 반응용액으로 TLC를 하여 보면 자외선에 대해서 강한 흡수를 나타내는 아주 극성이 큰 물질만이 확인되었으나, L-sorbose의 acetonide들은 전혀 검색되지 않았다. 이 반응계에 존재하는 물질은 *n*-butanol-물-빙초산(4 : 1 : 1)으로 실리카겔 TLC를 하면 L-sorbose보다 낮은  $R_f$  값 0.1을 보이면서 원점에서부터 끌렸다.

일반적인 산 촉매 케탈(ketal) 형성반응은 반응물과 생성물이 서로 평형을 유지하면서 일어난다는 것으로 되어 있어 반응에서 생성되는 수분을 제거시키는 것이 반응을 이동시키는 관건이 될 것이다. 그러나 본 실험의 결과에서 살펴보면 L-sorbose가 용해된 아세톤 용액내의 황산을 중화한 후에야 비로소 여러 acetonide들이 나타나고 있어 L-sorbose의 acetonide가 생성될 때 monoacetonide가 반응의 중간체로서 개여되지 않는다는 것이 명백하다.

따라서 L-sorbose diacetonide의 생성에는 다른 중간체가 관련되고 있는 것으로 생각된다.

L-sorbose가 황산을 가한 아세톤 용액에 완전히 녹아 들어간 후(약 4시간 걸림)에 용액 속에 존재하는 황산을 제거하기 위하여 중화제를 사용한다. 현재 보고된 중화제로는 NaOH수용액<sup>16)</sup>이나 무수  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ <sup>17)</sup>가 주로 사용되는 것으로 되어 있다. 본 실험에서 이들 중화제를 사용하여 실험한 결과 최고 70%의 수득율로 L-sorbose의 diacetonide가 생성되는 것을 확인하였으며 두 개의 L-sorbose의 monoacetonides들을 부산물로 얻었으며, 단순한 재결정 조작으로 이들을 제거시킬 수 없었다.

여러 종류의 중화제를 사용하여 L-sorbose가 녹아 들어간 아세톤 용액을 중화하여 본 결과가 Table 1에 요약되어 있다. 그런데 NaOH 펠렛을

**Table 1**—The yields and the products of sorbose acetonoids formed by neutralization of the  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -sorbose-acetone solution with various inorganic bases

Inorganic bases	equiva- lents	acetonoids produced	
		diace- tonoid	monoace- tonoids
NaOH solution(1N)	1.20	60%	40%
NaOH Pellets	1.19	95%	5%
CaO Pellets	1.36	50%	50%
Ba(OH) <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O Pellets	1.20	50%	50%
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (anhydrous) Pellets	1.20	70%	30%

중화제로 사용하면 monoacetonide들의 생성비율은 5% 이하로 떨어지고 거의 순수한 L-sorbose diacetonide만을 얻을 수 있었다. 얻어진 L-sorbose의 diacetonide와 monoacetonide들을 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼으로 조사하여 본 결과 diacetonide는 원하는 L-sorbose의 2,3;4,6-diacetonide로 확인되었으며, monoacetonides들은 L-sorbose의 2,3-acetonide와 1,2-acetonide로 확인되었다.

황산을 NaOH 펠렛으로 중화하는 경우에 L-sorbose의 diacetonide가 높은 수율로 생성되는 것은 NaOH 펠렛이 황산의 중화제로서 작용할 뿐만아니라 acetonide를 형성할 때 생성되는 물을 제거하는 흡습제로서의 역할을 수행하기 때문이라 생각된다. 따라서 이 방법을 사용한다면 L-sorbose의 diacetonide를 높은 수율로 생산할 수 있을 뿐만아니라, 그 정제과정에서 monoacetonide들을 재사용하는 과정이 필요없어진다.

모든 당의 diacetonide합성에 있어서 아세톤량은 30당량 이상을 사용하는 것이 일반화되어 있다.<sup>18)</sup> 본 연구에서도 L-sorbose의 acetonide 합성에서 L-sorbose에 대해서 황산을 1.5당량으로 일정하게 유지하면서 아세톤량을 변화시켜 반응을 진행시키었을 때 L-sorbose에 대해 아세톤을 10, 15 그리고 30당량을 사용하여 반응시켰을 때에 L-sorbose가 acetone에 녹아 들어가는 데에 4.5, 3.5 그리고 2.5시간이 각각 요하였고 diacetonide와 monoacetonides가 20 : 80, 30 : 70 그리고 95 : 5의 비율로 각각 생성되었다. 이

결과에서 보면 아세톤량이 10당량에서 30당량으로 증가함에 따라, 아세톤에 L-sorbose가 녹아 들어가는 시간이 짧아지고 용액속의 황산을 중화시킨 후에 생성된 L-sorbose acetonide 경우에도 diacetonide가 monoacetonide보다 더 높은 비율로 생성되는 것을 볼 수 있다. 따라서 L-sorbose를 L-sorbose diacetonide로 전환시키는 가장 적절한 아세톤량은 L-sorbose에 대해 30당량으로 밝혀졌다. 30당량의 아세톤에 황산을 3, 1 그리고 0.5당량을 가하여 L-sorbose를 용해시켜 동일한 반응을 시켰을 때 생성되는 L-sorbose의 monoacetonide와 diacetonide의 비율에는 변화가 관찰되지 않았으나, L-sorbose가 아세톤에 녹아 들어가는 속도에 차이가 보여 2, 2.5 그리고 7 시간이 각각에 대하여 걸렸다. 주어진 결과를 보면 황산량이 1당량 이상 들어갔을 때는 L-sorbose가 아세톤에 용해되는 시간에는 큰 차이가 관찰되지 않았다. 황산을 많이 사용하면 황산 자체의 경비뿐만 아니라 중화제의 소요량도 동시에 증가될 것이므로 1당량의 황산을 사용하여 반응하는 것이 가장 유리한 것으로 확인되었다.

L-Sorbose diacetonide를 2-keto-L-gulonic acid diacetonide로 산화시키는데에, 시약으로 용이하게 구입할 수 있는 antiformin을 사용하여 반응을 수행하였을 때에 73%의 수율이 얻어졌다. 이 반응에서는 농염산을 가하여서 침전을 시키는 조작할 시에 정확한 양의 염산을 적정해주는 것이 수율을 향상시킬 수 있는 관건이 되는 것으로 사료된다.

2-Keto-L-gulonic acid diacetonide를 L-ascorbic acid로의 전환에 있어서는 산촉매로 케탈의 파괴반응과 고리화반응을 한 단계에 수행하여 2-keto-L-gulonic acid diacetonide로부터 L-ascorbic acid를 거의 정량적으로 얻어낼 수 있었다. 결정으로 나온 생성물의 IR 스펙트럼은 문헌치와 동일하였다.<sup>19)</sup>

## 결 론

본 연구에서는 Vitamin C의 국내 생산에 기여

하기 위하여 일련의 연구를 수행하였다. 본 연구에서 밝혀진 바에 따르면 sorbitol(현재 국내에서 대량으로 생산되고 있음)를 *G. suboxydans*를 이용하여 거의 정량적으로 sorbose로 변형시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. Batch 배양과정에서 본 연구에서는 20%의 농도까지 sorbitol을 가하여 주어도 무난히 sorbose가 90%의 수득률로 생성되는 것으로 밝혀졌다. Sorbose는 본 연구에서 개발한 황산-NaOH 방법에 의하여 90%의 수득률로 sorbose diacetonide로 변형시킬 수 있으며 sorbose diacetonide는 70% 이상의 수득률로 산화시켜 90%의 수득률로 락톤화시켜 Vitamin C로 변형시킬 수 있었다. 그래서 본 연구에서 개발한 과정에 따르면 Glucose는 정량적으로 Sorbitol로 바뀌기 때문에 Glucose 2kg에서 부터 1.2kg의 Vitamin C를 생성할 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어 졌음을 밝히며 이에 감사드리는 바이다.

## 문 헌

- 1) Crawford, T.C., and Crawford, S.A.: *Adv. carbohydr. Chem. Biochem.* 37, 79 (1980).
- 2) Reichstein, T., Grussner, A. and Oppenauer, R.: *Helv. Chim. Acta.* 16, 561 (1933).
- 3) *Japan Kokai* 7700,255 (C.A. 87, 53526d (1977).)
- 4) Underkofler, I.A.: *J. Am. Chem. Soc.* 58, 1012 (1936).
- 5) Kulhanek, M.: *Adv. Appl. Microbiol.* 12, 11 (1970).
- 6) *U.S.S.R. SU* 1,057,504 (C.A., 100, 121545y (1984)).
- 7) Gurnikov, Kh. I., Shnaiderman, G.B., Anisimov, I.E. and Pa'chik, K.B.: *Khim. Farm. Akh.* 14, 81, (1980) (C.A., 93 101439a (1980)).
- 8) Meller, E.A., Seleanov, L.G., Luknitskii, F.I., Sukhmaneva, L.M. and Veksler, M.A., *Novosti Elektrokhim. Org. Soedin., Tezisy Dokl. Vses.*

- Soveshch. Elektrokhim. Org. Soedin., 8th 1973, Ed., Feoktistov, L.G., Zinatne, Riga, USSR, (1973). (C.A., 82, 36560q (1975)).
- 9) Weijlard, J.: *J. Am. Chem. Soc.* 67, 1031 (1945).
- 10) *Indian IN* 149, 287 (C.A., 97 72714m (1982)).
- 11) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press
- 12) Hockett, R.C. and Downing, K.T.: *J. Am. Chem. Soc.* 64, 2463 (1942).
- 13) Theander, O. and Bakke, J.: *J. Chem. Soc. D*, 175 (1971).
- 14) Reichstein, T. and Grussner, A.: *Helv. Chim. Acta.* 17 311 (1934).
- 15) Brady, Jr., R.F.: *Adv. Carbohydr. Chem.* 26, 197 (1971).
- 16) Ohle, H. *Ber.* 71, 562 (1938).
- 17) Freudenberg, K. and Hixon, R.M.: *Ber.* 56, 2119 (1923).
- 18) Fischer, E. and Rund, C.: *Ber.* 49, 88 (1916).
- 19) Hvoslef, J. and Kläboe, P.: *Acta. Chem. Scand.* 25, 3043 (1971).