

잎담배중 유리 및 Glycoside형태로 존재하는 휘발성 향기성분

김영희, 나도영, 김옥찬, 서철원, 김용태

한국인삼연초연구소 화학부

Free and Glycosidically Bound Volatile Components in Tobacco Leaves (*Nicotiana tabacum* L.)

Y. H. Kim, D. Y. Ra, O. C. Kim, C. W. Seo and Y. T. Kim

Division of Chemical Research, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute

ABSTRACT

Free and glycosidically bound volatiles from three green tobacco leaves (NC 82, KF 109 and Br-21) were separated by nonionic resin Amberlite XAD-2 adsorption column chromatography and elution by selective solvents. Aglycones from the glycosidically bound fractions were released by enzymatic hydrolysis with almond β -glucosidase. A total of 20 components identified from free and glycosidically bound fractions, the major components were benzaldehyde, benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, 3-oxo-ionol, 3-hydroxy- β -ionone, 3-oxo-7, 8-dihydro- α -ionol and scopoletin. Six C_{13} norisoprenoids identified in this study, which have been described to possess a characteristic tobacco aroma-enhancing effect, were not presented in free forms but rather bound glycosidic forms.

서 론

잎담배에 함유되어 있는 정유성분은 양적으로는 미량이지만 잎담배의 품질을 좌우하는 중요한 인자로서 이들은 주로 생엽을 수확한 후 건

조(curing), 숙성(aging)하는 과정에서 당류, 단백질, 아미노산, 폴리페놀, 알칼로이드 및 각종 색소류와 같은 비 휘발성 성분들이 분해되어 생성된다.^{7,9,19)}

최근까지 건조 잎담배로 부터 1100여종 이상

의 휘발성 성분들이 확인되어 있는데²⁰⁾ 그 중에서도 특히 향각미의 형성에 중요한 역할을 하는 성분으로서 분자내에 2, 6, 6-trimethylcyclohexane 환을 가지고 있는 C₁₃ norisoprenoid 화합물에 대해서 많은 연구가 행해져 왔으며^{5,6,20)} 그 이유는 이 성분들이 양적으로는 미량이지만 최소감지량(threshold)이 극히 낮고 독특한 향 특성(hay-like, floral, woody and fruity aroma)을 지니고 있어 양질엽 잎담배 향기발현의 key flavor로서 역할을 하기 때문이다.^{5,21)} 이와같은 C₁₃ norisoprenoid 화합물들은 잎담배를 수확후 건조, 숙성과정에서 효소적 또는 비 효소적 산화반응에 의해서 색소인 carotenoids가 분해되어 생성되는 것으로 알려져 왔다.^{7,9)} 그러나 최근 다수의 C₁₃ norisoprenoid 화합물들이 신선한 식물체의 잎이나 과실류에서 β-glycoside의 형태로서 당류와 결합되어 존재하는 사실이 밝혀졌다^{23,25)}. 또한 Anderson 등^{2,5)}은 잎담배로 부터 glycoside의 형태로 존재하는 ionine유도체 및 vetispirane sesquiterpene 화합물들을 분리 확인한 바 있고, Kodama 등¹⁰⁻¹²⁾은 β-glycoside의 형태로 존재하는 각종 C₁₃ norisoprenoid 화합물들을 분리 확인하고 이러한 성분들은 잎담배를 수확후 건조, 숙성과정에서 가수분해 효소인 β-glycosidase에 의해 glycosides가 가수분해되어 생성된다고 제안하였다.¹²⁾ 또한 최근에는 잎담배의 생엽에서 solanacone, solavetivone, rishitin, 1β-hydroxydebneyol과 같은 sesquiterpene 화합물들이 glycoside 형태로 존재하는 것으로 밝혀졌으며^{13,18)} 이외에도 지방족 및 방향족 알코올, monoterpene 및 페놀화합물들이 각종 식물체에서 glycoside의 형태로 존재하는 것이 밝혀진 바 있다.^{8,15,23)}

따라서 본 실험에서는 잎담배 생엽중에서 유

리 형태의 휘발성 성분(free volatiles)과 glycoside 형태로 당류와 결합하여 존재하는 성분들(glycosidically bound volatiles)을 분리한 다음 β-glycosidase를 사용하여 이를 가수분해시켜 생성된 aglycones을 분석하고 동시에 두 분획간의 구성성분의 차이점과 담배 품종간의 차이를 비교코저 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 잎담배인 NC 82, KF 109 및 Br-21은 1991년 한국인삼연초연구소 대구시험장에서 재배한 것으로서 각 시료는 7월 초순경 시험포에서 채취한 적숙엽을 실험실에 운반하여 생엽의 상태로 실험에 사용하였다.

2. Glycoside분획의 분리

주맥을 제거한 생엽 500g에 β-glycosidase(제^{23,25)}로서 0.2M glucono-δ-lactone을 함유한 0.2 M phosphate완충액(pH 7.0) 1ℓ를 가한 다음 Waring blender로 1분간 마쇄한 후 Celite층을 통과시켜 흡인 여과하였다. 여과액은 Gunata 등의 방법⁸⁾에 따라서 비 이온성 수지인 Amberlite XAD-2(20-50mesh, Fluka제)를 충전한 관(2.0×50cm)을 통과시켜 당류등 흡착되지 않은 성분들은 증류수 1.5ℓ로 세척하여 제거하고 유리 형태의 휘발성 성분들은 내부표준물질로서 n-nonanol (650 ug)을 함유한 n-pentane과 ethyl ether 혼합액(1:1, v/v) 500ml로 용출시켜 분리하였고, glycoside 형태로 존재하는 휘발성 성분들은 methanol 500ml로 용출시켜 분리하였다. Methanol 용출액은 감압농축한 후 0.2M citrate-phosphate

완충액(pH 5.0) 50ml에 용해시킨다음 잔존하는 유리 형태의 휘발성 성분들을 제거하기 위하여 ethyl ether(50ml×3)로 추출하여 위에서의 용출액과 합하였다. 수용액층은 β-glycoside 가수분해 효소로서 almond β-glucosidase(Fluka제) 50mg을 가한 다음 37°C에서 48시간 동안 가수분해하였다. 유리된 aglycones은 내부표준물질로서 n-nonanol(650ug)을 함유한 n-pentane과 ethyl ether혼합액(50ml×3)으로 추출하였다. 두 추출액은 무수 황산나트륨으로 탈수후 30°C이하에서 감압농축하여 분석시료로 사용하였다.

3. 분석

가스 크로마토그래피(GC)는 Hewlett-Packard (HP) 5880A형 GC 및 5880A형 적분기를 사용하였다. 분리관은 DB-1 fused silica 모세관(30m×0.32mm, 막 두께: 0.25μm)을 사용하였고 분리관 온도는 60°C에서 3분간 유지후 230°C까지 분당 3°C씩 승온하여 230°C에서 20분간 유지하였다. 주입구와 검출기온도는 280°C로 하였고 운반기체는 질소(1.2ml/min)를 사용하여 split mode로 주입하였다. 가스 크로마토그래피-질량분석계(GC-MS)는 HP 5890GC와 HP 5970 mass selective detector(MSD)를 사용하였다. 분리관은 HP-1 fused silica 모세관(20m×0.20mm, 막 두께: 0.25μm)을 사용하였고 분리관 온도는 50°C에서 230°C까지 분당 2°C씩 승온하였다. 주입구 온도는 250°C, 운반기체는 헬륨, 이온화 전압 70eV, interface 온도230°C, 이온원 압력은 1.0×10⁻⁵torr로 하였다.

결과 및 고찰

잎담배 생엽중 유리형태로 존재하는 휘발성

성분과 glycoside 형태로 존재하는 휘발성 성분을 조사하기 위하여 잎담배를 phosphate 완충용액으로 추출한 다음 비 이온성 수지인 Amberlite XAD-2를 충전한 관을 사용하여 분리하였다. 이때 유리형태로 존재하는 휘발성 성분은 n-pentane과 ethyl ether혼합액으로 용출시켜 분리하였고 glycoside형태로 존재하는 성분들은 methanol로 용출시킨 다음 almond β-glucosidase를 사용하여 가수분해하여 생성된 aglycones를 GC-MS로 분석하였다.

이러한 방법에 의해 flue-cured 잎담배인 NC 82와 KF 109 및 air-cured 잎담배인 Br-21로부터 얻어진 각 추출액의 가스 크로마토그램들은 Fig. 1, Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. 또한 각 추출물로부터 확인된 성분들은 Table 1과 같다.

확인된 성분들은 구조상으로 볼때 크게 방향족 알코올, C₁₅ norisoprenoids 및 기타 화합물군으로 분류할 수가 있다. 방향족 알코올인 benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol은 건조 잎담배 정유성분의 중성분획에 많이 함유되어 있는 성분들로서 알려져 있는데^{5,9)} 본 실험결과에 있어서도 양적으로 많이 검출되었다. 본 실험결과에서 보면 이 알코올들은 유리형태 및 glycoside결합의 형태로도 존재하는 것으로 볼 수 있는데 이러한 현상은 각종 식물체의 잎이나 과실류에서도 보고된바 있으며^{8,26)} 2-phenylethyl alcohol의 경우는 뚜렷한 경향을 보이지 않았으나 benzyl alcohol의 경우 glycoside의 형태보다는 유리형태로 많이 존재하는 경향을 보였으며 담배 품종간에 비교시 benzyl alcohol의 경우 air-cured인 Br-21보다는 flue-cured인 NC 82와 KF 109에서 많이 함유된 경향을 보인 반면 2-phenylethyl alcohol은 Br-21에 많이 함유된 경향을 보였다.

Table 1. Distribution of free and glycosidically bound volatiles in tobacco leaves

Peak no	Component	ug/g(wet base)					
		Flue-cured				Air-cured	
		NC 82		KF-109		Br-21	
		F	B	F	B	F	B
1	Benzaldehyde	1.52	0.25	1.99	0.24	0.31	0.53
2	Benzyl alcohol	5.22	0.66	2.62	1.01	1.63	0.36
3	Acetophenone	0.29	0.07	0.21	0.06	—	—
4	Guaicol	—	0.05	—	—	—	0.27
5	2-Phenylethyl alcohol	0.92	0.81	0.48	0.65	2.68	0.30
6	2,6,6-Trimethyl-4-methylene cyclohex-2-en-1,4-dione	—	0.13	0.46	0.39	—	0.95
7	2,3-Dihydrobenzofuran	—	0.17	—	0.17	—	0.49
8	Indole	—	0.07	—	0.12	—	0.06
9	<i>p</i> -tert-Butyl benzoic acid	—	0.12	—	0.17	—	0.11
10	Vanillin	—	0.09	—	0.12	—	—
11	<i>p</i> -tert-Butyl catechol	1.59	0.08	3.58	—	—	0.10
12	Diethyl phthalate	—	0.09	—	0.11	—	—
13	3-Hydroxy- β -damascone	—	0.11	—	0.23	0.11	0.56
14	3-Oxo- α -ionol	—	1.39	—	2.48	0.27	5.32
15	3-Hydroxy- β -ionone	—	0.17	—	0.61	0.31	3.72
16	3-Oxo-7,8-digydro- α -ionol (Blumenol C)	—	2.22	—	0.92	—	1.33
17	4-(3-Hydroxybutylidene)-3,5,5- trimethyl-2-cyclohexene-1-one	—	0.15	—	0.22	0.15	0.42
18	4-(1-Hydroxy-4-keto-2,6,6-trimethyl -2-cyclohexe-1-yl)-but-3-en-2-ol (Vomifoliol)	—	0.55	—	0.16	—	0.56
19	<i>p</i> -Methoxy- α -methyl cinnamic aldehyde	—	0.77	—	0.55	0.32	1.04
20	Scopoletin	—	2.19	0.21	3.32	0.29	3.67

F : free volatiles B : glycosidically bound volatiles

한편 잎담배의 향 특성 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 C₁₃ norisoprenoid 화합물로서는 3-hydroxy- β -damascenone을 포함하여 6종이 확인되었다. 이 성분들은 3-oxygenated α - 또는 β -ionol 유도체의 형태로 존재하는 것이 특

징적인데 이러한 형태의 α - 또는 β -ionol 유도체들은 과실류인 quince²³⁾, papaya¹⁵⁾, grape²⁵⁾ 및 passion fruit²⁴⁾에서도 확인된 바 있다.

잎담배에서 이러한 성분들은 대부분 Fig. 4에 서와 같이 β -D-glucopyranoside의 형태로 존재하

앞담배종 유리 및 Glycoside 형태로 존재하는 휘발성 향기성분

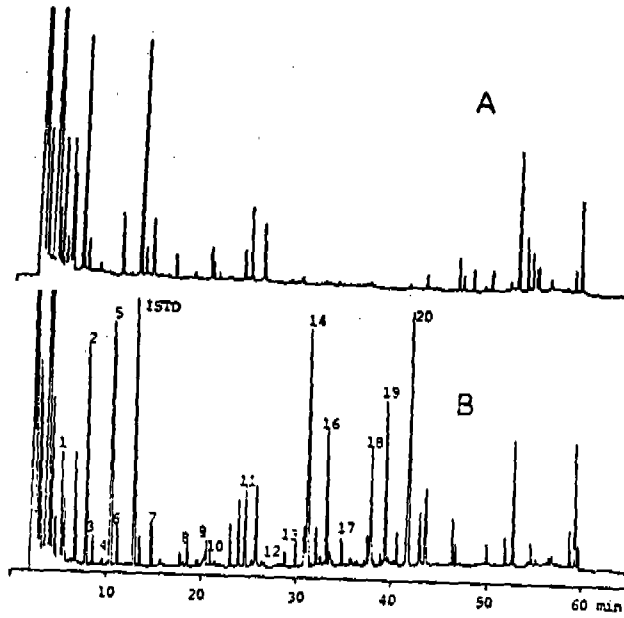


Fig. 1. Gas chromatograms of free(A) and glycosidically bound(B) volatiles from NC-82 tobacco leaves.

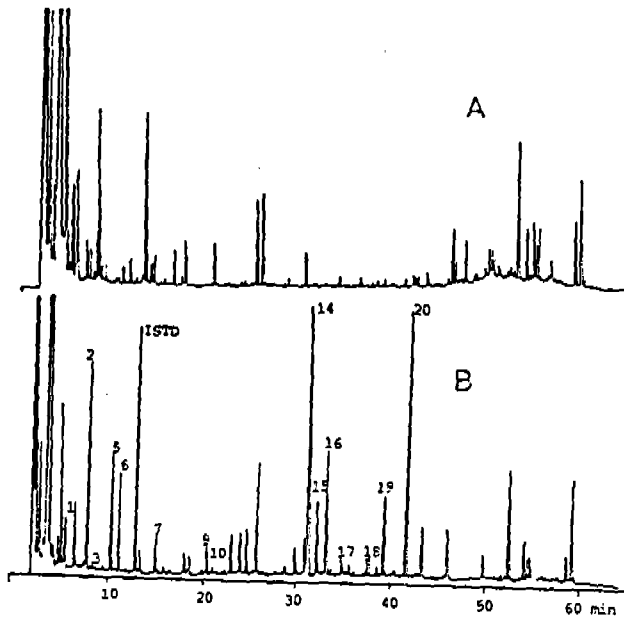


Fig. 2. Gas chromatogram of Free(A) and glycosidically bound(B) volatiles from KF-109 tobacco leaves

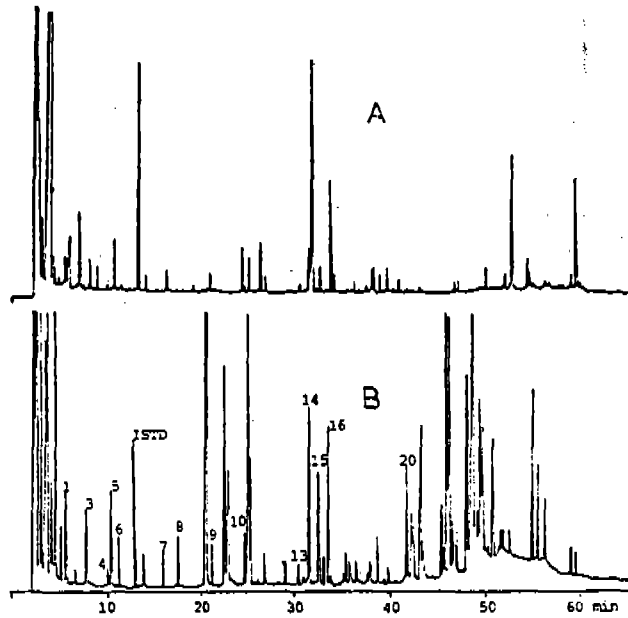


Fig. 3 : Gas chromatogram of free(A) and glycosidically bound(B) volatiles from BR-21 tobacco leaves

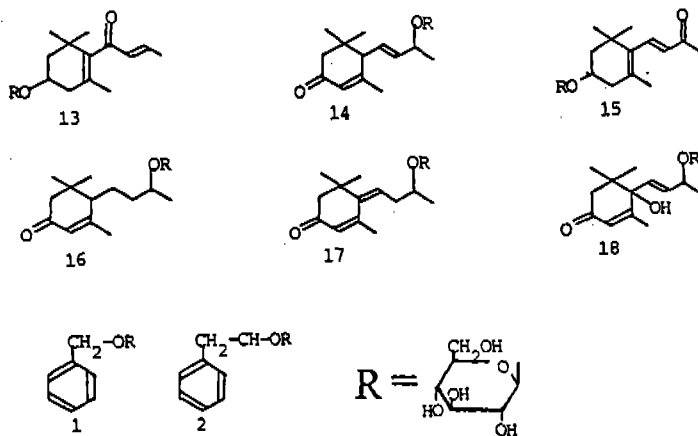


Fig. 4. Aromatic alcohol and C₁₃ norisoprenoids liberated by enzyme hydrolysis from glycoside fraction of tobacco leaves
The numbers correspond to the numbers in Table 1.

는 것이 Anderson 등²⁴⁾, Kodama 등^{10,12)}에 의해서 확인된 바 있는데 특히 Anderson 등²⁾은 잎담배 또는 관상엽등에 이러한 glycoside 화합물들을 가 향료로서 첨가시 가공과정에서 휘산에 의한 손실이 적고 연소과정에서 분해됨으로서 담배의 향긋미를 크게 개선시키는 효과가 있다고 보고한 바 있다.

또한 3-oxo- α -ionol은 Burley종 잎담배 특징적인 향기 발현의 key flavor로 작용하는 것으로 알려져 있는 4종의 megastrigma-4, 6, 8-trien-3-one 유도체의 합성중간체로 알려져 있는데¹⁾ 이 성분은 또한 결사슬이 포화된 상태인 3-oxo-7,8-dihydro- α -ionol 및 자리 올긴 이중결합을 지니고 있는 3-oxoretro- α -ionol의 생성과도 밀접한 관계가 있다. 3-Oxoretro- α -ionol은 orient 잎담배를 연상시키는 특징적인 향기를 지닌 7-oxo-7,8-dihydro-roedulan의 전구체로 알려져 있으며²²⁾, 3-oxo-7,8-dihydro- α -ionol과 3-oxoretro- α -ionol은 Fujimori 등⁵⁾ 및 Lloyd 등¹⁴⁾에 의해서 잎담배에서 확인된 바 있다. 잎담배 종류별로 비교해 볼때 NC 82와 KF 109에서는 이러한 C₁₃ norisoprenoid 화합물들의 대부분이 유리형태의 휘발성 성분 분석에서는 거의 검출되지 않고 glycoside 결합의 형태로 존재하는 것으로 나타난 반면 Br-21의 경우는 양적으로는 미량이지만 유리형태의 휘발성 성분분석에서도 검출되는 경향을 보였는데 이러한 현상은 생엽을 채취후 실험에 사용하기 전까지의 기간동안 잎담배중에 존재하는 효소에 의해 glycoside들의 일부가 가수분해된데 기인하는 것으로 판단되나 이에 대해서는 보다 더 실험해 보아야 할 것으로 판단되며 양적으로 볼때 3-hydroxy- β -damascenone과 3-oxo- α -ionol 및 3-hydroxy- β -ionone은 Br-21에서 많이 검출되었으나

3-oxo-7,8-dihydro- α -ionol은 NC 82에서 많이 검출되었다.

한편 coumarin 유도체인 scopoletin은 잎담배 및 담배의 연기중에서도 확인된 성분으로서¹⁶⁾ 본 실험결과에서 보면 이 성분이 잎담배중에서 주로 glycoside 형태로 존재하고 있음을 알 수 있으며 구조상으로 판단할 때 이 성분은 잎담배중에 존재하는 scopolin 또는 scopoletin- β -gentiobioside가 가수분해되어 생성됨을 알 수 있다.

결 론

잎담배 생엽(NC 82, KF 109 및 Br-21)으로부터 비 이온성 수지인 Amberlite XAD-2 흡착 및 methanol 용출법에 의하여 유리형태 및 glycoside 형태로 존재하는 휘발성 성분분획을 분리한 다음 glycoside 분획은 almond β -glucosidase에 의해 가수분해하여 유리된 aglycones를 GC 및 GC-MS에 의해 분석하였다. 세 종류의 잎담배로부터 20종의 성분을 확인하였으며 각 잎담배에서 공통적인 주성분은 benzaldehyde, benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, 3-oxo- α -ionol, 3-hydroxy- β -ionone, 3-oxo-7,8-dihydro- β -ionol 및 scopoletin 등이었다. 그중 특히 잎담배 향기발현에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 C₁₃ norisoprenoid 화합물은 6종이 확인되었으며 이 성분들의 대부분은 생엽에서 유리형태로 보다는 glycoside 형태로 당류와 결합하여 존재하였다.

참 고 문 헌

1. Aasen, A. J., B. Kimland, S. O. Almquist and C. R. Enzell, Acta. Chem. Scand., 26B

- : 2573-2576(1972).
2. Anderson, R. C. and D. M. Gunn, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 27(1977).
 3. Anderson, R. C., D. M. Gunn, and J. A. Gibson, G. B. Patent 1508616(1978).
 4. Anderson, R. C. and D. M. Gunn, G. B. Patent 1508617(1978).
 5. Fujimori, T., K. Kasuga, H. Matsushita, H. Kaneko and M. Noguchi, Agric. Biol. Chem., 40 : 303-315(1976).
 6. Fujimori, T., R. Kasuga, H. Kaneko and M. Noguchi, Beitr. Tabakforsch. Int., 9 : 317-325 (1978).
 7. Fujimori, T. and H. Kaneko, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 53 : R95-R121(1979).
 8. Gunata, Y. Z., C. L. Bayonove, R. L. Baumes and R. E. Cordonnier, J. Chromatogr., 331 : 83-90(1985).
 9. Kaneko, H., Koryo, 128 : 23-33(1980).
 10. Kodama, H., T. Fujimori and K. Kato, Agric. Biol. Chem., 45 : 941-944(1981).
 11. Kodama, H., T. Fujimori and K. Kato, Agric. Biol. Chem., 46 : 1409-1411(1982).
 12. Kodama, H., T. Fujimori and K. Kato, Phytochemistry, 23 : 583-585(1984).
 13. Kodama, H., T. Fujimori H. Tanaka and K. Kato, Agric. Biol. Chem., 49 : 1527-1528(1985).
 14. Lloyd, R. A., C. W. Miller, D. L. Roberts, J. A. Giles, J. P. Dickerson, N. H. Nelson, C. E. Rix and P. H. Ayers, Tob. Sci., 20 : 40-48(1976).
 15. Schwab, W., C. Mahr and P. Schreier, J. Agric. Food Chem., 37 : 1009-1012(1989).
 16. Stedman, R. L., Chem. Rev., 68 : 153-205(1968).
 17. Strauss, C. R., B. Wilson and P. J. Williams, Phytochemistry, 26 : 1995-1997(1987).
 18. Tazaki, H., H. Kodama, A. Ohinishi and T. Fujimori, Agric. Biol. Chem., 55 : 1889-1890 (1991).
 19. Wahlberg, I., K. Karlsson, D. J. Austin, N. Junker, J. Roeraade and C. R. Enzell, Phytochemistry, 16 : 1217-1231(1977).
 20. Weeks, W. W., 39th T. C. R. C., 11 : 175-200(1985).
 21. Wilson, R. A., B. D. Mookherjee and J. K. Vinals, Tobacco Reporter, Oct. : 42-46(1983).
 22. Winter, M., K. H. Schulte-Elte, A. Velluz, J. Limacher, W. Pickenhagen and G. Ohloff, Helv. Chim. Acta., 62 : 131-134(1979).
 23. Winterhalter, P. and P. Schreier, J. Agric. Food Chem., 36 : 560-562(1988).
 24. Winterhalter, P., J. Agric. Food Chem., 38 : 452-455(1990).
 25. Winterhalter, P., M. A. Sefton and P. J. Williams, J. Agric. Food Chem., 38 : 1041-1048(1990).
 26. Yano, M., K. Okada, K. Kubota and A. Kobayashi, Agric. Biol. Chem., 54 : 1023-1028 (1990).