

Sophorose의 제조-II. 효모(*Torulopsis bombicola*) 배양액 및 회화나무(*Sophora japonica*)로부터 Sophorose의 제조

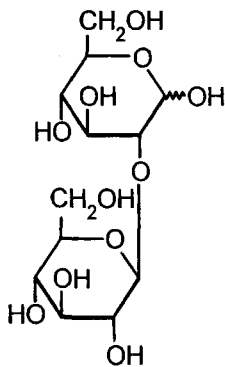
백남인* · 이미자¹ · 이유희¹ · 박종대¹ · 김해영 · 김신일¹

경희대학교 산업대학, ¹한국인삼연초연구원

초록 : 효모(*Torulopsis bombicola*)를 풍기름으로 강화한 배지에서 25°C로 7일간 진탕배양하였다. 얻어진 배양액으로부터 sophorose-lipid를 분리하였고, 이를 알칼리처리하여 sophorose를 제조하였다. 또한 배양액중의 sophorose를 아세틸화한 후 silica gel column chromatography하여 아세틸화물을 분리하였고, 이를 실온에서 알칼리 처리하여 sophorose를 제조하였다. 한편, 회화나무(*Sophora japonica*)의 미숙과실의 MeOH 추출물을 용매분획한 후, 얻어진 *n*-BuOH 분획을 silica gel column chromatography하여 플라보노이드 배당체 분획을 분리하였고, 이를 0.02 N H₂SO₄로 가수분해하여 sophorose를 제조하는 방법을 확립하였다.(1997년 1월 8일 접수, 1997년 2월 17일 수리)

서 론

Sophorose (2-O-β-D-Glucopyranosyl-D-glucopyranose)는 미생물대사에 미치는 영향¹⁾이 크며, 천연에서 발견되는 배당체중에는 sophorose 구조를 갖는 것이 압도적으로 많기 때문에 이의 대량제조에 관한 연구가 여러 가지 방법^{2,4)}으로 시도되었다. 저자들은 전보³⁾에서 2분자의 D-glucose로부터 sophorose를 화학적으로 합성하는 방법에 관하여 보고한 바 있다.



sophorose

한편, 효모중에는 배지중에 그 영양원으로 지질성분을 첨가할 경우 다량의 sophorose-lipid를 생산⁵⁾하는 것이 알려져 있다. 이들은 지금까지는 생체유래의 계면활성제 개발이라는 측면에서만 주로 관심을 끌어왔기 때문에, 이들로부터 sophorose를 제조하는 방법에 관해서는 연구 보고된 바가 없다. 그러나 적당한 효모의 선발, 최적의 배양조건 및 수율 높은 화학반응 조건을 확립하게 된다면, sophorose 제조에 있어서의 유용한 방법이 될 수 있을 것이다. 또한 식물중에

는 2차대사산물로서 배당체를 함유하고 있는 것들이 많이 있는데, 그 당부구조중에는 sophorose를 부분구조로 갖는 것이 압도적으로 많다. 따라서 sophorose 배당체를 함유하는 식물로부터 이 배당체를 분리하고, 이를 부분 가수분해하여 제조하는 방법을 생각할 수 있다. 특히 플라보노이드 배당체와 같은 aromatic 배당체 결합은 aliphatic 배당체 결합과는 화학적 반응성에 있어서 차이를 보이기 때문에 가수분해시 선택성을 부여할 수 있을 가능성이 높다.

이번에 저자들은 효모의 일종인 *Torulopsis bombicola*의 배양액으로부터 sophorose-lipid를 분리하고 이를 알칼리처리하여 sophorose를 제조하는 방법과, 배양액중의 sophorose를 직접 분리하는 방법을 확립하였다. 또한 회화나무 (*Sophora japonica*)의 미숙과실로부터 플라보노이드 배당체를 분리하고 이를 선택적으로 가수분해하여 sophorose를 제조하는 방법을 확립하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70~230 mesh, Merck)을, 그외의 시약은 모두 일급, 또는 특급을 사용하였다.

¹H- (400 MHz) 및 ¹³C-NMR (100 MHz) spectra는 BRUKER ARX 400으로 측정하였고, FAB-MS Spectrum은 VG-VSEQ(EBqQ Type)/VG Analytical로 측정하였으며, HPLC는 Shimadzu SCL-10A를 사용하였다.

식물시료

본실험에서 사용한 회화나무 미숙과실은 1995년 11월에 충남대학교에서 채집하였으며, 생명공학연구소 이형규 박사가 동정하였고, 풍건한 후 저온에서 저장하였다. (시료번호

찾는말 : sophorose, *Torulopsis bombicola*, sophorose-lipid, *Sophora japonica*, flavonoide-sophoroside

*연락처자

호 KGT-95-0147)

효모 및 배양조건

본 실험에서 이용한 효모(*Torulopsis bombicola*)는 생명공학연구소 (ATCC 22214)에서 분양받았으며, 한국인삼연구소 연구원에 보관되어 있다. 배지의 조성은 glucose (10%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.33%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5%), NaCl (0.01%), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.01%), yeast extract (0.5%), soybean oil (10%)과 같았다. 배양액 (1 l)의 산도를 4.0으로 조정하고, 25°C에서 60 rpm으로 교반하고, 7일간 왕복진탕배양하였다.

효모배양액으로부터 sophorose-lipid의 제조

배양액을 5000 g에서 10분간 원심분리한 후, 상등액은 ethyl acetate (400 ml×3), *n*-BuOH (400 ml×2) 및 물 (500 ml)로 용매분획하여 3개의 분획을 얻었고, 잔사는 MeOH (100 ml×2)로 추출하고 농축한 후, ethyl acetate (30 ml×3), *n*-BuOH (30 ml×2), 물 (50 ml)로 용매분획하고 위에서 얻어진 각각의 분획과 합쳤다.

Ethyl acetate 분획과 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel column chromatography 하였는데, 먼저 CHCl_3 -MeOH (4 : 1)의 용매로 용출하였고 소량씩 분취하였다. 분취액을 TLC로 확인하여 분획을 나눈 후, 다시 sophorose-lipid 함유분획에 대하여 silica gel column chromatography [CHCl_3 -MeOH- H_2O (65 : 35 : 10)] 하여 760 mg의 sophorose-lipid를 분리하였다. Sophorose-lipid : ¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) 5.18 (1H, t, $J=6.7$ Hz, olefinic-H), 4.46 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 4.28 (1H, d, $J=7.7$ Hz)(H-1, 1'), 3.09~3.71 (16H, sophorosyl-H), 2.16 (2H, t, $J=7.3$ Hz, methylene-H), 1.88 (2H, m, methylene-H), 1.45 (4H, m, methylene-H), 1.08~1.16 (20H, methylene, methyl-H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) : 174.6 (carbonyl-C), 129.2, 128.9, 127.8, 147.4, (olefinic-C), 101.9, 101.6 (anomeric-C), 77.2, 76.9, 76.0, 75.7, 75.4, 73.8, 68.9, 68.1, 62.3, 61.7 (sophorosyl-C), 35.2, 33.4, 28.8, 28.7, 28.5, 28.3, 27.9, 27.7, 27.6, 27.3, 26.2, 24.4, 24.2, 23.8 (methylene-C), 19.6, 19.4 (methyl-C).

위에서 얻어진 sophorose-lipid 화합물 (700 mg)을 MeOH 20 ml에 녹인 후, 10% KOH/MeOH 5 ml를 가하고 5시간 환류하였다. 반응액에 산성이온교환수지 (Dowex 50 w×8, H⁺ form)를 가하여 중화한 후, 여과하고 감압농축하였다. 농축물을 silica gel column chromatography (CHCl_3 -MeOH- $\text{H}_2\text{O}=6 : 5 : 1$) 하여 205 mg의 sophorose를 분리하였다. 분리한 sophorose는 표품과 직접 비교하였고, 문헌의 물리화학적 데이터^{24,27}와 비교하였다.

위에서 얻어진 수층분획을 XAD-II column chromatography하였는데, 먼저 물로 용출하였고, 다음에 MeOH로 용출하였다. 물용출물을 감압 농축하였으며, 얻어진 농축물에 pyridine 20 ml를 가한 후, 자석교반기로 교반하면서 빙냉하에서 acetic anhydride 15 ml를 적하하였다.

실온에서 15시간 교반후, 빙냉수를 가하고 EtOAc (200 ml×3회)로 추출하였다. 유기층을 5% HCl, 포화 NaHCO_3 , NaCl로 차례로 씻어내고 무수 MgSO_4 로 탈수한 후 여과하고 감압 농축하였다. 농축물을 silica gel column chromatography (*n*-hexane-EtOAc=2 : 1) 하여 sophorose의 아세테이트화합물 60 mg을 얻었다. Sophorose-octaacetate : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) : 6.30 (1H, d, $J=3.8$ Hz, H-1), 4.90~5.44 (5H, H-3, 4, 2', 3', 4'), 4.61 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 4.01~4.32 (5H, H-5, 6, 6'), 3.90 (1H, dd, $J=3.9, 10.0$ Hz, H-2), 3.67 (1H, m, H-5'), 2.23, 2.17, 2.11, 2.07, 2.03, 2.02, 2.00, 1.99 (each 3H, all s, acetyl-methyl); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3) : 171.30, 171.13 (×2), 171.02, 170.36, 170.13, 169.94, 169.65 (acetyl-carbonyl × 8), 101.64, 89.31 (C-1, 1'), 77.07 (C-2), 73.22, 72.80, 72.75, 72.60, 71.72, 68.85, 67.80 (C-3, 4, 5, 2', 3', 3', 5'), 62.13, 61.59 (C-6, 6'), 21.35, 21.31, 21.29, 21.21, 21.19, 21.18 (×2), 21.16 (acetyl×8), FAB-MS (m/z) : 679 (M+H)⁺, 663, 635.

위에서 얻어진 아세테이트 화합물에 5% KOH/MeOH 10 ml를 가하고 50°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액을 산성 이온 교환수지 (Dowex 50 w×8, H⁺ form)로 중화하고, 여과한 후 감압 농축하였다. 농축물을 앞에서와 같은 방법으로 chromatography 하여 20 mg의 sophorose를 분리하였다.

회화나무로부터 sophorose의 분리제조

회화나무 (*S. japonica*)의 미숙과실 풍건 시료 200 g을 막자사발로 마쇄한 후, 80% MeOH 수용액(1 L)으로 실온에서 1일간 2회 반복 추출하였다. 추출물을 감압하에서 농축하였고, 농축물을 H_2O (300 ml)와 *n*-BuOH (200 ml×3)로 분배 추출하였다. *n*-BuOH 층을 감압농축한 후, silica gel column chromatography (*n*-BuOH-EtOAc=2 : 1) 하여 플라보노이드배당체 분획을 얻었다.

위에서 얻어진 분획을 MeOH 100 ml로 녹이고 0.02 N H_2SO_4 20 ml를 가한다음 6시간 환류하였다. TLC (CHCl_3 -MeOH- $\text{H}_2\text{O}=6 : 5 : 1$)로 반응액중의 sophorose 생성을 확인한 후 반응을 종결시켰고, 포화 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 용액으로 중화하고, zeolite column으로 여과한 후 여액을 감압농축하였다. 농축물을 silica gel column chromatography (CHCl_3 -MeOH- $\text{H}_2\text{O}=6 : 5 : 1$) 하여 618 mg의 sophorose를 얻었다.

황산으로 처리하여 얻어진 가수분해물중의 sophorose를 HPLC를 이용하여 확인하였다. HPLC : column; analytical-bondapak NH_2 (4.5×20 m/m), mobile phase; AcCN- $\text{H}_2\text{O}=90 : 10$, flow rate; 1.0 ml/min, detector; RI, Rt=7' 17".

결과 및 고찰

Sophorose는 2분자의 D-glucopyranose가 2-O-β 결합하고 있는 2당화합물로, 천연중에 단독으로 존재하는 경우도 있으나, 대개는 식물배당체의 구성성분으로 존재한다. 효모중에 대사산물로서 sophorose나 sophorose의 당지질을 생

산하는 것²⁾이 있어서 이들 배양액으로부터 sophorose를 제조하는 방법에 관하여 검토하였다. 또한 sophorose를 구성당으로 갖는 flavonoid 배당체가 함유된 회화나무 미숙과실로부터 선택적 가수분해 방법을 적용하여 제조하는 방법을 확립하였다.

Sophorose-lipid를 생산하는 효모중에서 *T. bombicola*를 사용하였고, 일반적으로 많이 사용하는 효모 배지에 영양원으로서 glucose 외에 soybean oil을 다량 (10%) 첨가하여 배양하였다. 배지의 pH를 4로 조절하고 25°C에서 비교적 빠른 속도인 60 rpm으로 교반하며 7일간 배양하였다. 교반 속도를 빠르게 하여 통기조건을 충분히 좋게 하였을 때, TLC로 확인하며 배양 중점을 검토한 결과 7일째가 적당한 것으로 판단되었다.

배양액을 원심분리하여 상등액과 잔사를 분리하였고, 각각은 EtOAc, *n*-BuOH, H₂O로 차례로 분배 추출하였다. EtOAc와 *n*-BuOH 분획은 TLC로 확인해본 결과 모두 sophorose-lipid 화합물을 함유하고 있었다. 또한 수층에는 대부분의 당이 glucose였으나 소량으로 sophorose가 함유되어 있는 것이 확인되었다.

EtOAc 분획과 *n*-BuOH 분획중에는 알칼리처리에 의해 쉽게 sophorose가 생성되는 sophorose-lipid 화합물뿐만 아니라, 알칼리처리에 의해서는 sophorose가 생성되지 않는 sophorose-lipid 화합물 및 soybean oil의 구성성분인 불포화 지방산도 다량으로 함유되어 있었다. 따라서 이들 분획을 silica gel column으로 chromatography하여 이용가능한 sophorose-lipid 만을 분리하였다.

위에서 분리한 sophorose-lipid 화합물의 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD)을 보면, 지방산 유래의 olefinic-H가 triplet으로 5.18 ppm에서, sophorose 유래의 2개의 anomeric-H가 4.46 ppm, 4.28 ppm에서 doublet으로 관측되었다. 또한 3.09~3.71 ppm에서 당부 유래의 signal이 관측되었고, 1.08~2.16 ppm에서 지방산 유래의 signal이 관측되었다. ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD)에 있어서도, 지방산 유래의 carbonyl (δ 174.6)과 olefinic (δ 129.2, 128.9, 127.8, 127.4) 탄소가 관측되었고, sophorose 유래의 2개의 anomeric 탄소 (δ 101.7, 101.6)와 당부 유래의 탄소들 (δ 77.2, 76.9, 76.0, 75.7, 75.4, 73.8, 68.9, 68.1, 62.3, 61.7)이 관측되었다. 또한 지방산의 말단 methyl signal (δ 19.6, 19.4)이 관측되었고, 23.8~35.2 ppm에서 많은 methylene signal들이 관측되었다. 이상의 결과로부터 분리된 lipid 화합물은 2분자의 D-glucopyranose가 2-O- β 결합한 sophorose 구조를 갖고 있는 것으로 밝혀졌으며, 당부의 각 수산기에 여러 종류의 지방산이 에스터결합한 혼합물인 것으로 추정되었다.

Sophorose-lipid의 ester 결합을 알칼리로 분해하면 sophorose가 얻어졌고 silica gel column chromatography하여 정제하였다. 분리한 sophorose는 표품과 직접 TLC, HPLC로 비교하였고, 문헌의 물리화학적 데이터^{24,7)}와 비교하였으며, NMR 데이터를 해석하여 동정하였다.

한편, 수층에는 효모가 생산한 소량의 sophorose와 함께 다량의 glucose가 함유되어 있었고, 배지 유래의 무기물도

높은 함량으로 잔존하고 있었다. 따라서 먼저 XAD-II column으로 chromatography 하여 무기물과 당류를 분리하였다. 당류 분획중에는 여전히 glucose가 주성분으로 존재하고 있었기 때문에, 분리를 용이하게 하기 위하여 pyridine 용매하에서 acetic anhydride를 이용하여 아세틸화하였다. 아세틸화된 당부 혼합물로부터 silica gel column chromatography하여 용이하게 sophorose의 아세틸화합물을 분리하였다.

Sophorose의 아세틸 화합물의 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum에 있어서 H-1과 H-1'이 6.26 ppm과 5.67 ppm에서 각각 doublet으로 관측되었는데, 이때 coupling constant가 3.6 Hz, 8.2 Hz로 C-1은 α , C-1'은 β 결합하고 있는 것을 알 수 있었다. 그외 당부 signal이 3.81~5.11 ppm에서, 8개의 acetyl-methyl signal이 2.0 ppm 부근에서 모두 관측되었다. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum에 있어서도 8개의 acetyl-carbonyl (δ 181.1, 180.0, 179.9, 179.7, 179.4, 179.2, 179.0, 178.8)과 2개의 anomeric (δ 92.0, 89.5), 당부 유래의 다른 10개의 signal (δ 77.4, 72.7, 72.6, 69.8, 69.2, 69.0, 67.4, 67.2, 62.0, 61.9) 및 20 ppm 부근에서 acetyl-methyl signal 들이 관측되었다. 위에서 얻은 octaacetylsophorose의 아세틸기를 알칼리로 제거하여 sophorose를 제조하였다.

회화나무 (*S. japonica*)의 미숙과실중에는 sophorose를 구성당으로 갖는 flavonoid 배당체가 다량 함유되어 있는 것으로 보고 되어 있다.⁸⁾ 11월에 채집한 회화나무 미숙과실 풍건 시료의 MeOH 추출물을 *n*-BuOH과 물로 분배 추출하였다. TLC로 확인한 결과 *n*-BuOH층에 대부분의 flavonoid 배당체가 함유되어 있는 것이 확인되었다. *n*-BuOH층을 silica gel column chromatography 할 때 용출용매로 *n*-BuOH-EtOAc를 쓰면 다른 배당체와 flavonoid 배당체가 용이하게 분리되었다. 얻어진 flavonoid 배당체를 산으로 가수분해 할 때에 플라보노이드와 glucose간의 배당체결합은 절단하면서 glucose간의 배당체 결합에는 영향을 미치지 않는 반응조건을 검토한 결과 0.02 N H₂SO₄로 6시간 환류하였을 때에 sophorose의 생성수율이 가장 좋았다. 이때 sophorose의 생성을 TLC와 HPLC로 확인하였는데, sophorose 표준품의 경우 Rt이 7.28분이었으며, 산가수분해물의 경우 같은 Rt을 갖는 peak가 관찰되었으므로 sophorose가 생성된 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 생성된 sophorose를 silica gel column chromatography 하여 sophorose를 분리, 제조하였다.

효모로부터의 제조방법은 효모 배양액 1L로부터 225 mg의 sophorose를 분리하였으므로 아직 만족할 만한 수준은 아니라고 할 수 있으나, 배양조건을 여러가지로 재검토 함으로서 추후 충분히 그 제조수율을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 한편, 배지에 soybean oil을 첨가하지 않고 효모를 배양하였을 때의 sophorose생산에 관하여 예비실험을 수행하였는데, TLC로 확인할 수 있을 정도의 sophorose 생산은 인정되지 않았다. 따라서 soybean oil은 제2영양원으로서의 의미뿐만 아니라 본실험에서 사용한 효모가 2분자의

glucose를 이용하여 sophorose구조를 생성하는데에 중요한 역할을 담당하는 것으로 사료되며, 추후 이에 대한 상세한 검토가 필요할 것으로 생각된다. 회화나무로부터 플라보노이드 배당체를 분리하고 약산으로 부분 산가수분해하여 얻는 방법은, 미숙과실 200 g에서 618 mg의 sophorose를 분리할 수 있었고, 방법 자체에는 어려운 점이 없다고 보나, 시료의 수집, 배당체의 분리 및 약산으로 산가수분해시의 반응조건 조절등에 시간과 노력이 많이 소요되었으므로 효율적인 제조방법은 아니었다.

참 고 문 헌

1. Mandels, M. and E. T. Reese (1959) Biologically active impurities in reagent glucose. *Biochem. Biophys. Research Commun.* **1**, 338-340.
2. Walker, T. K., D. N. Pellegrino and A. W. Khan (1959) Formation of gentibiose, sophorose and other oligosaccharides by *Acetobacter* species growing in glucose media. *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 161-169.
3. Vis, E. and H. G. Fletcher, Jr. (1956) Stevioside. IV. Evidence that stevioside is a sophoroside. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4709-4710.
4. Freudenberg, K., H. Knauber and F. Cramer (1951) Die bereinstimmung der Sophorose mit 2- $[\beta$ -Glucosido]-glucose. *Chem. Ber.* **84**, 144-146.
5. 백남인, V. P. Anufriev, 박종대, 이유희, 김신일 (1996) Sophorose의 제조-I. D-Glucose로부터 sophorose의 화학적 합성. *한국농화학회지* **39**, 512-516.
6. Stodola, F. H., M. H. Deinema and J. F. T. Spencer (1967) Extracellular lipids of yeasts. *Bacteriol. Reviews* **31**, 194-213.
7. Coxon B. and H. G. Fletcher, Jr. (1960) Simplified preparation of sophorose (2-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucose). *J. Org. Chem.* **26**, 2892-2894.
8. Rabate, J. and J. Dussy (1938) Etude biochimique des fruits de *Sophora japonica* L. III. Sur un holodiglycoside nouveau extrait du Sophoraflavonololide. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **20**, 467-470.

Preparation of Sophorose-II. Preparation of Sophorose from the Culture Broth of *Torulopsis bombicola* and the Pod of *Sophora japonica*

Nam-In Baek*, Mi Ja Lee¹, You Hui Lee¹, Jong Dae Park¹, Hae-Yeong Kim and Shin Il Kim¹ (*College of Industry, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea*)

Abstract : A yeast, *Torulopsis bombicola*, was cultured in the media fortified with soybean oil as a additional carbon source for 7 days with reciprocal shaking. From the culture broth, sophorose-lipid was isolated and treated with alkali to afford sophorose. The sophorose contained in the medium was acetylated and isolated through silica gel column chromatography. The acetylated sophorose was hydrolyzed with 5% KOH at room temperature to give rise to sophorose. Meanwhile, the MeOH extracts obtained from the pod of *Sophora japonica* was solvent-fractionated with *n*-BuOH and H₂O, and butanolic layer was chromatographed on silica gel column to afford a flavonoide-glycoside. The glycoside was hydrolyzed with 0.02 N H₂SO₄ to yield sophorose.

Key words : sophorose, *Torulopsis bombicola*, sophorose-lipid, *Sophora japonica*, flavonoide-sophoroside

*Corresponding author