

Bacillus licheniformis 배지의 Isoflavonoids¹

이학주² · 박영기³ · 이재필⁴ · 이상현⁵ · 여운홍² · 오정수³

Isoflavonoids from the liquid media of *Bacillus licheniformis*¹

Hak-Ju Lee² · Youngki Park³ · Jae-Phil Lee⁴ · Sang-Hyun Lee³
Woon-Hong Yeo² · Jung-Soo Oh³

요 약

*Bacillus licheniformis*의 액체배지를 부탄올(butanol)로 추출한 후 헥산(*n*-hexane), 에틸아세테이트(EtOAc)등의 용매를 사용하여 순차 연속추출하여 분획하였다. 이중 에틸아세테이트 가용부에 대해서 칼럼 크로마토그래피법을 사용하여 물질을 분리하였으며, 여기서 단리되어진 화합물들을 Mass, NMR등의 분광학적 방법을 사용하여 그 화학구조를 조사한 결과, 이소플라보노이드인 diadzein, genistein 그리고 그 배당체인 genistin으로 각각 동정하였다.

ABSTRACT

Using liquid media of *Bacillus licheniformis*, extraction with butanol and fractionation with *n*-hexane and ethyl acetate(EtOAc) were performed. From the EtOAc fraction, the isolation was also performed using chromatography.

Three isoflavonoids were isolated from the liquid media of *Bacillus licheniformis* and identified as diadzein, genistein and genistin by Mass and NMR spectroscopic analysis.

Keywords : Isoflavonoid, *Bacillus licheniformis*, diadzein, genistein, genistin

1. 접수 2001년 11월 30일 Received on November 30, 2001

2. 임업연구원 화학미생물과 Div. Wood Chemistry and Microbiology, KFRI, Seoul, 130-712, Korea

3. 동국대학교 산림자원학과 Dept. of Forest Resources Dongguk Univ, Seoul, 100-715, Korea

4. 동아대학교 농생물학과 Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A Univ., Pusan, 604-714, Korea

5. 임업연구원 산림생물과 Div. Forest Biology, KFRI, Seoul, 130-712, Korea

서론

*Bacillus sp.*은 토양이나 공기중에서 쉽게 분리되는 미생물로 당이나 암모늄, 유기산, 알코올 등이 함유된 합성배지에서도 잘 성장한다⁶⁾. 세포와 가수분해성 효소를 생산함으로써 다당류나 핵산 및 지질 등을 잘 분해시키며, 분해가 잘 되지 않는 단백질, 전분, 지방 등도 분해시키는 균으로 현재 산업적으로도 이용되고 있다. 또한 탈취효과가 높아 분뇨 및 축산폐수 처리에 있어 고도처리 및 악취제거에도 사용된다. 이러한 관점에서 균의 분해능력을 이용하여 산업적으로 적용하거나 혹은 식품 폐기물을 분해하려는 노력이 시도되고 있다.

비지는 콩을 물에 하룻밤 담갔다가 건져낸 다음 물을 조금 첨가하여 분쇄한 후 다시 여기에 3~4배의 물을 더하여 15분 정도 가열한 다음 여과하고 남은 찌꺼기다. 비지에는 섬유질이 많으나 콩의 단백질과 지방질이 남아 있다. 가용성 단백질이 대부분 제거되었기 때문에 일부는 가축의 사료로 이용되기는 하나 대부분 폐기되어 환경오염 등의 문제를 야기시키고 있어 이에 대한 적절한 처리가 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 *Bacillus licheniformis* 14-2 균주를 사용하여 식품폐기물인 비지를 발효시켜 얻어진 분해산물을 분석하여 이용가치를 탐색하고자 물질을 단리하여 그 화합물들의 화학구조를 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

2.1 공시재료

2.1.1 배양액 및 추출

구입한 비지를 5%(w/v)로 희석하여 5L의 비지배지를 만들고, 살균한 후 12시간 배양된 *Bacillus licheniformis* 14-2 균주를 접종하였으며, 발효기의 교반속도는 300rpm, 온도는 30℃, 통

기량은 1.2vvm, pH는 조절하지 않고 72시간 배양한 후, 그 배양액을 원심분리(3000rpm, 20분)하여 그 상등액을 수집하여 부탄올(butanol)로 2회 추출하였다.

2.1.2 용매분획

BuOH 조추출물을 Fig. 1과 같이 헥산(*n*-Hexane), 에틸아세테이트(EtOAc) 등의 용매를 사용하여 순차 연속추출하여 분획하였다. 이중 에틸아세테이트 가용부(2.95g)를 MeOH:EtOH(1:1,v/v)를 전개용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼(75×4.5cm) 크로마토그래피 방법을 이용하여 13.5ml씩 용출시켜 100개의 분취물을 얻었으며, 각 분취물은 박층크로마토그래피(TLC; silica gel 60 F₂₅₄, 전개용매; toluene:ethyl formate:formic acid=5:4:1,v/v)상에서 UV(254nm)로 검색하여 5개의 분획물(BL-1~BL-5)로 나누었다.

2.1.3 기기분석

단리한 화합물의 질량(EI-MS)스펙트럼은 JEOL JMS-600W, 핵자기공명(NMR) 스펙트라(¹H-, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, NOESY, HMQC, HMBC)은 기초과학연구원 서울분소의 Varian UI 500을 이용하여 측정하였다.

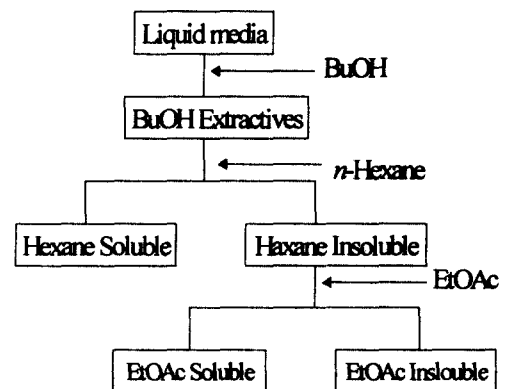


Fig. 1. Fractionation procedure of the liquid media of *Bacillus licheniformis*.

2.2 각 화합물의 단리

2.2.1 화합물 I (diadzein)

위의 BL-3의 분획물(427mg)을 CHCl₃:MeOH (19:1, v/v)을 용출용매로 한 Silica gel 칼럼(62 × 2.5cm) 크로마토그래피 방법을 이용하여 8ml씩 분취하여 120개의 분취물을 얻었으며, TLC에 전개시킨 후, UV로 검색한 결과 4개의 분획물(BL-3-1~BL-3-4)로 나누었다. 이 중 BL-3-3의 분획물(16mg)을 CHCl₃:MeOH(5:1, v/v)를 전개용매로 한 prep. TLC(silica gel 60 F₂₅₄, 2mm)로 정제하여 화합물 I (6.3mg)을 단리하였다.

화합물 I의 EI-MS m/z : 254(M⁺), 197, 185, 167, 149, 137, 129, 111, 97, 78, 57(base ion). ¹H-NMR(500MHz, CD₃OD) : δ 6.44(1H, *d*, *J*=2.2Hz, H-8), 6.67(1H, *dd*, *J*=2.2, 9.0Hz, H-6), 6.76(2H, *dd*, *J*=2.0, 6.5Hz, H-3', 5'), 7.27(2H, *dd*, *J*=2.0, 6.5Hz, H-2', 6'), 7.83(1H, *d*, *J*=9.0Hz, H-5), 7.90(1H, *s*, H-2). ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) : δ 104.18(*d*, C-8), 113.40(*s*, C-10), 117.55(*d*, C-3', 5'), 121.89(*d*, C-6), 122.73(*s*, C-1'), 125.49(*s*, C-3), 127.11(*d*, C-5), 131.23(*d*, C-2', 6'), 153.15(*d*, C-2), 161.42(*s*, C-9), 162.05(*s*, C-4'), 176.66(*s*, C-7), 178.43(*s*, C-4). NOESY correlations : H-2 ↔ H-2'/6' HMBC correlations : H-2 → C-1'/C-3/C-4/C-9, H-5 → C-4/C-7/C-9, H-6 → C-8/C-10, H-8 → C-6/C-9/C-10, H-2'/6' → C-2'/C-3/ C-4'/C-6', H-3'/5' → C-1'/C-3'/C-4'/C-5'.

2.2.2 화합물 II (genistein)

위의 BL-2의 분획물(46mg)을 전개용매로서 CHCl₃:MeOH(5:1, v/v)를 사용한 prep. TLC을 이용하여 정제하여 화합물 II(6mg)를 단리하였다.

화합물 II의 EI-MS m/z : 270(M⁺, base ion), 243, 214, 154, 136, 118, 89. ¹H-NMR(500MHz, CD₃OD) : δ 6.07(1H, *d*, *J*=2.1Hz, H-6), 6.15(1H, *d*, *J*=2.1Hz, H-8), 6.83(2H, *dd*, *J*=2.1, 6.6Hz, H-3', 5'), 7.33(2H, *dd*, *J*=2.1, 6.6Hz, H-2', 6'), 7.91(1H, *s*, H-2). ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) :

δ 96.51(*d*, C-8), 102.46(*d*, C-6), 104.46(*d*, C-6), 104.20(*s*, C-10), 116.19(*d*, C-3', 5'), 123.83(*s*, C-1'), 124.12(*s*, C-3), 131.36(*d*, C-2', 6'), 153.90(*d*, C-2), 158.59(*s*, C-4'), 160.21(*s*, C-9), 163.37(*s*, C-5), 173.19(*s*, C-7), 181.36(*s*, C-4). HMBC correlations : H-2 → C-3/C-4/C-9, H-6 → C-5/C-7/C-8/C-10, H-8 → C-6/C-7/C-9/C-10, H-2'/6' → C-1'/C-2'/C-4'/C-6', H-3'/5' → C-1'/C-3'/C-4'/C-5'.

2.2.3 화합물 III (genistin)

위의 BL-4의 분획물(80mg)을 MeOH:H₂O (9:1, v/v)을 용출용매로 한 Sephadex LH-20 칼럼(65 × 2.5cm) 크로마토그래피 방법을 이용하여 4ml씩 분취하여 71개의 분취물로 분취한 후, UV검색 결과 4개의 분획물(BL-4-1~BL-4-4)로 나누었으며, 이 중 BL-4-2의 분획물(15mg)을 CHCl₃:MeOH(4:1, v/v)를 전개용매로 한 prep. TLC로 정제하여 화합물 III(9mg)을 분리하였다.

화합물 III의 EI-MS m/z : 270(M⁺-162, base ion), 243, 214, 154, 136, 118, 89, 69. ¹H-NMR(500MHz, CD₃OD) : δ 3.39(1H, *m*, H-4"), 3.41(1H, *m*, H-3"), 3.48(1H, *m*, H-2"), 3.50(1H, *m*, H-5"), 3.71(1H, *dd*, *J*=5.5, 12.1Hz, H-6"), 3.90(1H, *dd*, *J*=2.1, 12.1Hz, H-6"), 5.03(1H, *d*, *J*=7.1Hz, H-1"), 6.48(1H, *d*, *J*=2.0Hz, H-6), 6.65(1H, *d*, *J*=2.0Hz, H-8), 6.78(2H, *d*, *J*=8.5Hz, H-3', 5'), 7.31(2H, *d*, *J*=8.5Hz, H-2', 6'), 8.08(1H, *s*, H-2). ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) : δ 62.45(*t*, C-6"), 71.27(*d*, C-4"), 74.77(*d*, C-2"), 77.88(*d*, C-3"), 78.39(*d*, C-5"), 95.54(*d*, C-8), 101.22(*d*, C-6), 101.65(*d*, C-1"), 108.45(*s*, C-10), 117.73(*d*, C-3', 5'), 120.08(*s*, C-1'), 125.62(*s*, C-3), 131.24(*d*, C-2', 6'), 154.79(*d*, C-2), 159.43(*s*, C-9), 161.82(*s*, C-4'), 164.67(*s*, C-5, 7), 182.62(*s*, C-4). NOESY correlations : H-2 ↔ H-2'/6', H-8/6 ↔ H-1" HMBC correlations : H-2 → C-1'/C-3/C-4/C-9, H-6 → C-5/C-7/C-8/C-10, H-8 → C-6/C-7/C-9/C-10, H-2'/6' → C-2'/C-3/C-4'/C-6', H-3'/5' → C-1'/C-3'/C-4'/C-5', H-1" → C-7.

결과 및 고찰

3.1 화합물 I

주요한 분해산물의 하나로 여겨지는 화합물 I의 분자량[M⁺]은 EI-MS 스펙트럼에서 m/z 254로 나타났으며, 주요 이온 peak로서는 m/z 167, 149, 137등으로 나타났다. ¹H-NMR 스펙트럼에서는 δ 6.44(1H, J=2.2Hz H-8), δ 6.67(1H, J=2.2, 9.0Hz, H-6)의 2개의 doublet의 시그널과 δ 7.83(1H, J=9.0Hz H-5)에서의 한 개의 doublet 시그널은 ¹H-NMR에서 나타나는 전형적인 ABX spin system을 보여주고 있는 것으로 A환의 8위, 6위 및 5위의 proton으로 각각 귀속하였다. 또한 δ 7.90(1H, s)의 singlet의 시그널은 isoflavonoid의 H-2에 기인하는 것으로 화합물 I이 isoflavonoid 골격의 화합물임을 시사하고 있다⁵⁾. 이는 HMBC 스펙트럼에서 H-2와 C-1', C-4 및 C-9와의 교차 peak, 그리고 B환에서 유래하는 H-2'/6'와 C-3 사이의 교차 peak의 존재로부터도 확인되었다 (Fig. 3). ¹³C-NMR(DEPT) 스펙트럼에서는 총 15개의 탄소 시그널이 나타났으며, 이중 methine 탄소가 8개, quaternary 탄소가 7개임을 확인할 수 있었으며, δ 153.15의 시그널은 isoflavone의 C-2, 그리고 δ 178.43은 carbonyl 탄소에 유래하는 시그널로 C-4에 각각 귀속하였다²⁾. 이상의 분석결과, 화합물 I은 4', 7-dihydroxyisoflavone인 diadzein으로 동정되었다(Fig. 2).

이 화합물은 칩(*Pueraria tinctoria*), 대두(*Glycine max*)등의 콩과 식물에서 많이 존재하며, 진경작용이 있는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

3.2 화합물 II

화합물 II는 EI-MS에서 molecular ion peak(M⁺)가 m/z 270에서 나타났으며, ¹H-NMR 스펙트럼의 δ 6.15(1H, J=2.1Hz)의 singlet는

isoflavonoid 부분구조의 H-2에 기인하며, δ 6.07(1H, J=2.1Hz)과 δ 7.91(1H, J=2.1Hz)의 2개의 doublet의 시그널은 그 결합정수(J=2.1Hz)가 meta 결합에 기인하는 것으로 A환의 H-6과 H-8의 proton에 각각 귀속하였는데⁴⁾, 이는 화합물 II의 HMBC 스펙트럼에서 H-6의 proton과 C-5, C-7과, 그리고 H-8의 proton과 C-7, C-9와의 교차 peak의 존재로부터도 확인할 수 있었다. 또한 δ 6.83(2H J=2.1, 6.6Hz)과 δ 7.33(2H J=2.1, 6.6Hz)에 4H에 해당하는 두개의 double doublet 시그널은 ortho, meta결합에 유래하며 전형적인 1, 4-2치환 방향족의 존재를 의미하는 것으로 B환의 H-2', 6'과 H-3', 5'의 proton으로 각각 귀속하였으며⁷⁾, 이는 ¹H-¹H COSY Spectrum에서의 상관peak의 존재로도 확인할 수 있었다.

¹³C-NMR 스펙트럼에서는 15개의 탄소 시그널이 나타나 있으며, 이중 8개의 quaternary탄소의 존재를 확인할 수 있었다. 이중 δ 160.21, δ 163.37, δ 173.19의 시그널은 C-9, C-5 및 C-7의 탄소에 각각 귀속하였는데, 이는 화합물 II의 HMQC, HMBC 스펙트럼에서의 proton과 탄소 시그널과의 교차peak를 확인함으로써 가능하였다. 그외의 δ 153.90의 시그널은 C-2에, 그리고 δ 131.36, δ 116.19의 시그널은 1,4-2치환 벤젠핵에 유래하는 B환의 C-2', 6' 및 C-3', 5'의 methine탄소에 각각 귀속하였다. 이상의 결과, 화합물 II는 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone인 genistein으로 동정하였다³⁾(Fig. 2).

이 화합물은 에스트로젠(estrogen)작용이 있는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

3.3 화합물 III

화합물 III의 EI-MS 스펙트럼에서는 molecular ion peak(M⁺)가 나타나지 않았으며, m/z 270의 이온 peak은 aglycon부분구조에 기인한다. 화합물 III의 ¹H-NMR 스펙트럼의 δ

3.39에서 δ 5.03 사이에 당에서 기인하는 7H에 상당하는 proton 시그널을 관찰할 수 있으며, 이중 δ 5.03(1H, $J=7.1$ Hz)의 doublet 시그널은 glucose에서 유래하는 아노머 proton인 H-1"에, δ 3.71(1H, $J=5.5, 12.1$ Hz) 및 δ 3.90(1H, $J=2.2, 12.1$ Hz)의 2개의 double doublet 시그널은 H-6의 methylene proton으로 귀속하였다. 이것은 ^{13}C -NMR 스펙트럼의 δ 62.45의 시그널이 C-6 탄소로 귀속하였는데, DEPT 스펙트럼의 135° 에서 (-)피크로 나타나므로 methylene 탄소임을 알 수 있었다.

화합물 III의 ^{13}C -NMR에서는 총 21개의 시그널이 확인되었으며, 이중 δ 101.65의 시그널은 glucose의 C-1"에, 그리고 δ 71.27, δ 74.77, δ 77.88 및 δ 78.39의 시그널은 glucose부분 구조의 C-4", C-2", C-3" 및 C-5"의 methine탄소에 각각 귀속하였다¹⁾.

화합물 III의 HMBC스펙트럼의 δ 5.03(H-1")의 아노머 proton과 δ 164.67에 나타난 A환의 C-7 탄소와의 교차 peak를 나타냄으로서, glucose는 aglycon부분구조의 C-7에 glucosidic linkage에 의해 연결되어 있음을 알 수 있으며,

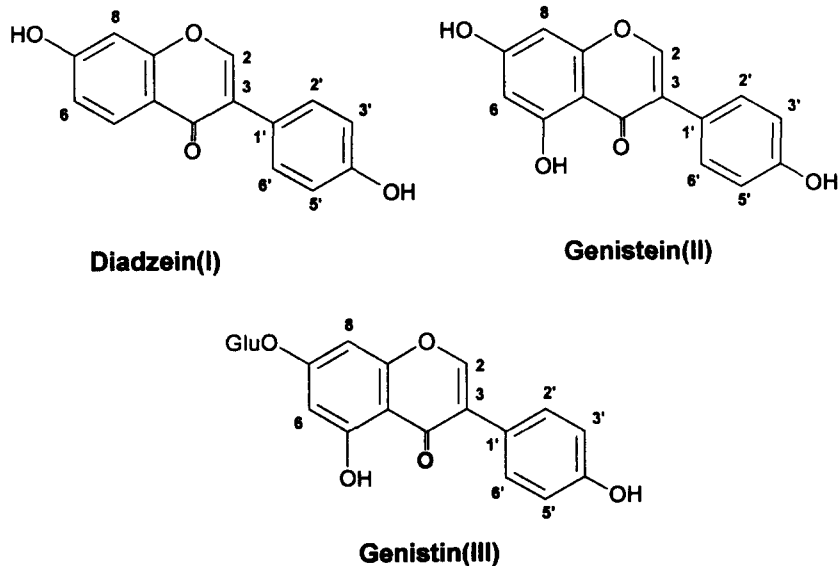


Fig. 2. Isoflavonoids from the liquid media of *Bacillus licheniformis*.

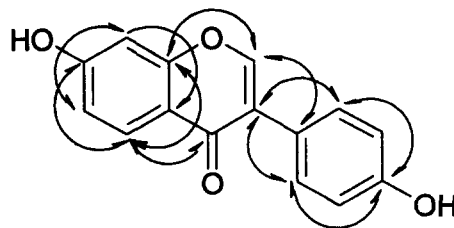


Fig. 3. Selected HMBC correlations for diadzein (I).

NOESY 스펙트럼에서도 H-1" proton과 A환의 H-6과 H-8 proton과의 상관 peak의 존재로부터도 확인할 수 있었다. 이상의 결과, 화합물 III은 genistein 7-O-glucoside 즉, genistin으로 동정하였다(Fig. 2).

결 론

Bacillus licheniformis 14-2 균주를 사용하여 식품 폐기물인 비지의 발효에 의한 분해산물로부터 경제적인 유용물질을 탐색·분리하고자 칼럼크로마토그래피 방법을 이용하여 물질을 분리하였으며, 단리된 화합물들은 NMR, MS 등의 기기분석에 의해 물질들의 화학구조를 구명한 결과, 이들은 이소플라보노이드인 diadzein(4', 7-dihydroxyisoflavone), genistein(4',5,7-trihydroxyisoflavone) 그리고 그 배당체인 genistin(genistein 7-O-glucoside)으로 각각 동정하였다.

인용문헌

1. Agrawal, P. K. 1989. Carbone-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, New York. pp. 208~209.
2. Charles, J. P. 1993. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H NMR Spectra vol. 2. pp. 920.
3. Harborne, J. B. 1994. The Flavonoids. Chapman & Hall, London. p. 129.
4. Mabry, T. J., K. R. Markham and M. B. Thomas. 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York. p. 253.
5. Talukdar, A. C. 2000. An isoflavone from *Myristica malabarica*. Phytochemistry 53 : 155~157.
6. Thomas D. G., M. T. Michael, 1991, Biology of Microorganisms. Prentice Hall, pp 776 ~777. New Jersey
7. 강삼식. 1982. NMR Spectroscopy를 이용한 flavonid의 성분분석과 그 실제. 약학회지 26(3): 139~148.
8. 奥田 祐男. 1990. 藥用天然物化學. 廣川書店, pp 66~76.