

Maltol- α -Glucoside 및 Ethyl Maltol- α -Glucoside의 효소적 합성

김삼곤 · 김근수 · 김영희*

KT&G 중앙연구원
(2002년 11월 11일 접수)

Enzymatic Synthesis of Maltol- α -Glucoside and Ethyl Maltol- α -Glucoside

Sam-Kon Kim, Kun-Soo Kim and Young-Hoi Kim^{*}

KT&G Central Research Institute
(Received November. 11. 2002)

ABSTRACT : Cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus macerans* synthesized maltol and ethyl maltol monoglucoside, with a series of its maltooligoglucosides by transglycosylation with dextrin as a donor, and maltol or ethyl maltol as an acceptor. The monoglucoside formed from reaction mixture of maltol or ethyl maltol by the successive actions of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase and *Rhizopus glucoamylase* was isolated by Diaion HP-20 column and silica gel column chromatography. The structure of the isolated monoglucoside was identified as maltol- α -D-glucoside and ethyl maltol- α -D-glucoside, respectively, by FAB-MS, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectra and products by hydrolysis with acid, α - and β -glucosidases.

Key words : Maltol, ethyl maltol, CGTase, transglycosylation, α -glucoside

단일 향료물질이나 식물중에 함유된 향기성분들은 일반적으로 지용성이어서 물에 잘 녹지 않고 휘발성이 강하기 때문에 향미 개선을 목적으로 이러한 물질들을 담배에 사용하게 되면 일담배의 가공과정이나 제품을 제조한 후 저장 또는 유통과정에서 휘산되어 제품의 품질을 악화시키는 원인이 되기도 한다. 이와 같은 문제점을 개선하기 위한 방안의 하나로써 비휘발성 유도체로 전환시키는 방법들이 많이 연구되고 있으며, 특히 분자내에

알코올기를 지닌 향료물질에 대해서는 화학적인 방법으로 당류를 결합시켜 배당체(glycoside)의 형태로 제조하여 활용하는 방법들이 보고된 바 있다 (Anderson *et al.*, 1976; Herron, 1989; 藤田 등, 1992; 二宮 등, 1992).

한편 향료물질중에서 maltol (3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one)은 각종 가열 가공식품 (Ito, 1972; Leblanc and Akers, 1989)이나 당류와 아미노산류의 Maillard 반응생성물 (Yaylayan and

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G 중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-Dong, Yuseong-Ku, Daejeon 305-805, Korea

Mandeville, 1994; Kim, *et al.*, 1996)에서도 많이 발견되며, 담배용 향료로서도 널리 사용하는 물질이다. Maltol은 sweet, fruity, caramel-like aroma로 묘사되는 강한 향기를 지니고 있을 뿐 아니라 다른 향을 증강시키는 효과 (flavor enhancer)가 있다. 또한 ethyl maltol(2-ethyl-3-hydroxy-4H-pyran-4-one)은 아직까지 천연에서는 발견되지 않은 화합물이나 maltol에 비해 6배 정도 향이 강한 특성이 있어 식품의 향미 개량제로 널리 사용되고 있다. 이와 같이 maltol과 ethyl maltol은 향료로서 범용적으로 사용되고 있음에도 불구하고 몇 가지 사용상의 제약을 받고 있는데 무엇보다도 물에 대한 용해도가 낮고, 비교적 낮은 온도에서도 서서히 승화되어 휘산되는 성질을 지니고 있을 뿐만 아니라 금속과 착물을 형성하여 쉽게 변색되기 때문에 유리나 플라스틱 용기에만 보관해야 하는 단점을 지니고 있다 (Lebranc and Akers, 1989). 따라서 이러한 단점을 개선하고 저장 및 가공과정에서 안정성을 증진시킬 목적으로 화학적 방법에 의한 배당체를 제조하는 방법을 개발하여 담배용 향료 및 담배 부류연의 향 개선제 (side stream smoke flavorant)로서 활용성을 검토한 바 있다 (Heron, 1989). 그러나 이와 같은 화학적 방법에 의한 배당체 제조방법들은 여러 단계의 화학적 반응을 거쳐야 하고 유독성의 무기 촉매제를 사용해야 하는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하는 방법으로서 최근에는 당 전이(transglycosylation) 활성을 지닌 효소를 이용하여 효소적 방법으로 배당체를 제조하려는 시도가 많이 이루어 졌으며, 이와같은 기술들의 일부는 이미 산업적으로 이용되고 있다.

한편 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)의 경우 원래 cyclodextrin을 제조하는데 사용되는 효소이나 최근에는 이 효소가 지니고 있는 당 전이 활성 (intermolecular transglycosylation)을 이용하여 배당체를 제조함으로써 이화학성 개선이나 새로운 기능성을 부여하기 위한 연구가 시도되었으며 (Kitahata, 1990; Okada *et al.*, 1991; Muto, 2001), 이러한 방법으로 제조된 새로운 물질들이 현재 식품, 첨가물 또는 의약품 등으로 사용되고 있는 예도 있다 (Yamamoto, 1989; Kitahata, 1990;

Suzuki and Suzuki, 1991)

따라서 본 연구에서는 maltol 및 ethyl maltol의 이화학성을 개선함으로써 활용증대 가능성을 조사할 목적으로 CGTase가 지니고 있는 당 전이활성을 이용하여 maltol 및 ethyl maltol의 배당체 합성을 시도한 바 그 결과를 보고코자 한다.

재료 및 방법

재 료

Maltol, ethyl maltol, rice α -glucosidase (G-9259) 및 *Aspergillus niger* cellulase (C-1184)는 Sigma사 (MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 효소로서 *Bacillus (B) stearothermophilus*에서 분리한 CGTase와 dextrin (DE #18)은 일본 Hayashibara사 (Okayama, Japan) 생물과학 연구소로 부터 분양받아 사용하였고, *B. macerans* 및 *B. circulans*에서 분리한 CGTase는 일본 Amano 제약 (Osaka, Japan) 으로부터 분양받아 사용하였다. *Rhizopus niveus* glucoamylase는 일본 생화학공업 (Tokyo, Japan) 제품을 구입하여 사용하였고, Diaion HP-20 수지는 일본 Mitsubishi사 (Tokyo, Japan) 제품을 사용하였으며, silica gel (70-230 mesh)은 Merck사 (Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다.

CGTase의 활성 측정

CGTase 활성은 Suzuki 등의 방법 (Suzuki and Suzuki, 1991)에 준하여 측정하였다. 즉 1 mM CaCl₂를 함유한 0.05 M 초산 완충용액 (pH 5.5)으로 용해시킨 0.3% 가용성 전분용액 5 ml에 효소액 200 μ l를 가한 다음 40 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 이어서 반응액 0.5 ml를 취하여 0.02 N H₂SO₄ 용액 15 ml와 0.1 N I₂ 용액 0.2 ml를 가한 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 분당 10%의 흡광도를 감소시키는데 소요되는 효소의 양을 1 단위 (unit)로 하였다.

Maltol 및 ethyl maltol 배당체의 제조

Maltol 또는 ethyl maltol (0.4 g) 및 dextrin (0.5 g)과 0.1 M CaCl₂ 0.1 ml를 0.1M 초산완충용액 (pH 6.0)에 용해시켜 10 ml로 한 다음 50 $^{\circ}$ C에서

48시간 반응시킨 후 수욕조에서 10분간 가열하여 반응을 종료하였다. 반응액의 일부는 1.0 M 초산 용액을 사용하여 pH 4.5로 조절후 glucoamylase (1.0 unit)를 가한 다음 50°C에서 7시간 반응시킨 후 수욕조에서 10분간 가열하여 반응을 종료하였다. 각각의 반응액에 메탄올을 가하여 3배로 희석한 다음 전개용매로서 n-butanol:acetic acid:water (2:1:1, v/v) 혼합액을 사용하여 HPTLC로 분리한 후 scanner로 270 nm에서 각 peak의 면적을 측정하여 당 전이 수율로 하였다

반응 생성물의 분석

HPTLC는 스위스 Camag사의 Linomat IV HPTLC와 TLC scanner를 사용하였다. ¹H-NMR (400 MHz) 및 ¹³C-NMR (100 MHz) spectra는 Bruker사의 AMX 400을 사용하여 측정하였고, 용

매로서 D₂O와 내부기준물질 (ISTD)로서 sodium trimethylsilyl propionate-2,2,3,3,-d₄ (DSS)를 사용하였다. Ultraviolet (UV) absorption spectra는 Beckman사의 DU-70 spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, 분자량 측정을 위한 FAB-MS는 JEOL JMS HX-110A (Tokyo, Japan)를 사용하였다.

결과 및 고찰

CGTase에 의한 유도체의 생성

각종 미생물에서 유래하는 β-glucosidase는 알코올기를 지닌 화합물의 β형 배당체 제조 연구에 많이 활용되고 있으나 phenolic 알코올기를 지니고 있는 maltol은 β-glucosidase에 의해서는 배당체가 생성되기 어려운 것으로 보고되어 있다 (Baba *et al.*, 1995). 따라서 본 연구에서는 각종

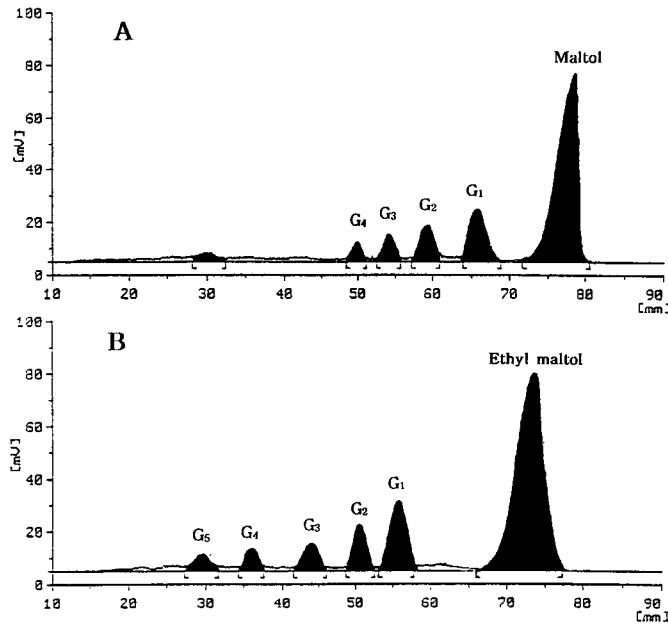


Fig. 1. HPTLC chromatograms of the reaction mixtures of dextrin and maltol (A) or ethyl maltol (B) with *B. stearothermophilus* CGTase. G₁: monoglucoside-like, G₂: maltoside-like, G₃-G₅: maltooligoside-like compounds. *B. stearothermophilus* CGTase (225 units) was incubated at 50°C for 48 hr in the dark with a mixture of dextrin (0.5 g) and maltol or ethyl maltol (0.4 g) in 10 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 6.0) with 0.1 ml of 0.1 M CaCl₂. After dilution with MeOH, HPTLC was done with a solvent system of n-butanol:acetic acid:water (2:1:1, v/v), and each peaks were scanned under UV irradiation (270 nm).

기능성 물질 제조연구에 자주 이용되는 CGTase를 이용하여 maltol 또는 ethyl maltol의 배당체 제조를 시도하였다. 효소로서 서로 다른 미생물에서 유래하는 3종의 CGTase를 사용하여 실험한 결과 *B. stearothermophilus*와 *B. macerans*에서 유래하는 CGTase에 의해서는 TLC 상에서 maltol 또는 ethyl maltol 보다 R_f 값이 낮은 수종의 반응 생성물이 생성되었으나 *B. circulans* CGTase에 의해서는 당 전이 생성물이 검출되지 않았다. 그 중 특히 당 전이활성이 강한 것으로 나타난 *B. stearothermophilus* CGTase에 의한 반응액을 HPTLC로 분석한 결과는 Fig. 1과 같으며, 이를 scanner를 이용하여 270 nm에서 각 peak의 면적을 측정하여 백분율로 표시한 결과는 Table 1과 같다.

Maltol 또는 ethyl maltol과 dextrin 혼합액에 *B. stearothermophilus* 및 *B. macerans* CGTase를 반응시켰을 때 G₁-G₅까지의 glucosides가 생성되었으며, 당 전이율은 *B. stearothermophilus* CGTase 사용시 maltol에서 26.4%, ethyl maltol에서 28.8%이었으나, *B. macerans* CGTase의 경우는 12-14% 수준이었다. 이러한 결과는 유사한 조건으로 *B. stearothermophilus* CGTase를 사용하여 반응시켰을 때 당 전이율이 rutin에서 45-68% (Suzuki and

Suzuki, 1991), ascorbic acid에서 약 33% (Yamamoto, 1989), 인삼 사포닌에서 47-79% (Kim *et al.*, 2001)이었던 것에 비해서는 수율이 낮은 편이었다.

또한 각각의 CGTase 반응액에 glucoamylase를 처리한 결과 maltol 또는 ethyl maltol oligosaccharides (G₂-G₅)로 간주되는 성분들은 대부분 감소한 반면 monosaccharide (G₁)로 간주되는 성분은 증가하였다. 이러한 결과는 CGTase가 dextrin의 가수분해 과정에서 생성된 glucosyl 잔사를 maltol 또는 ethyl maltol에 전이시킴으로써 maltol 또는 ethyl maltol oligosaccharides를 생성함을 나타내 주고 있다.

Maltol - α -glucoside의 분리 및 구조동정

당 전이 반응 생성물을 분리하여 구조를 동정코자 maltol 2 g과 dextrin 5 g, 0.1 M CaCl₂ 용액 1.0 ml를 함유하는 0.1 M 초산완충용액 (pH 6.0) 100 ml에 *B. stearothermophilus* CGTase 1,125 units를 가한 다음 50°C에서 48시간 반응시켰다. 반응액은 10분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 다음 4.0 M 초산용액으로 pH 4.5로 조정 후 glucoamylase (9.0 units)를 가하여 50°C에서 7시간 반응시킨 다음 위에서와 동일한 방법으로 효소를 불활성화시켰다. 반응액은 클로로포름으로 추출하여 미반응의 maltol을 제거한 다음 수용액 층은 Diaion HP-20 수지를 충전시킨 칼럼에 흡착시킨 후 증류수로 세척하여 미 흡착된 당을 용출, 제거하였다. 이어서 흡착된 생성물을 메탄올로 용출시킨 다음 이를 다시 silica gel 칼럼 크로마토그래피로 분리하여 maltol glucoside로 간주되는 무색 시럽상의 생성물 0.38 g을 얻었으며, 생성물은 여러 가지 용매조건에서 결정화를 시도하였으나 결정화되지 않았다. 생성물을 positive FAB-MS (m/z)로 분석결과 311 [M+Na]⁺로서 분자량이 288임을 알 수 있으며, ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ) 측정 결과 8.03 (d, 1H, J = 5.57 Hz, CH=CH-C=O), 6.52 (d, 1H, J = 5.56 Hz, CH=CH-C=O), 2.47 (s, 3H, CH₃)에서 proton signal이 검출되어 maltol의 존재가 시사되었다. 또한 5.52 (d, 1H, J = 3.74 Hz, anomeric H), 4.07-3.47 (glucosyl moieties)에 기인하여 maltol에 glucose 1 분자가 결합되어 있

Table 1. Transglycosylation to maltol and ethyl maltol from dextrin by cyclodextrin gluco-transferase

Acceptor	Relative ratio(%)			
	A	A-G ₁	A-G ₂	A-oligo
I Maltol	73.6	10.6	8.3	7.5
I Ethyl maltol	71.2	11.6	8.5	8.7
II Maltol	87.8	5.6	3.7	2.9
II Ethyl maltol	86.2	6.1	3.9	3.8

I : CGTase from *B. stearothermophilus*,
 II : CGTase from *B. macerans*,
 A : aglycone, G₁ : monoglucoside-like,
 G₂ : maltoside-like, oligo : maltooligoside-like compounds.

는 것으로 시사되었는데 특히 anomeric proton의 coupling constant (J)가 3.74 Hz 인 것으로 보아 α -anomer임을 알 수 있었다. 또한 ^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O , δ)에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 비당부의 chemical shifts가 maltol이고 여기에 glucose 1분자가 결합되어 있음을 알 수 있었으며, 생성물에 β -glucosidase를 반응시켰을 때에는 glucoside의 분해가 관찰되지 않았으나 α -glucosidase를 반응시켰을 때는 TLC 상에서 생성물이 감소하면서 maltol과 동일한 R_f 값을 갖는 물질이 생성되는 것으로 보아 maltol의 반응액으로부터 분리한 생성물은 maltol- α -D-glucoside로 동정되었다.

Table 2. ^{13}C -NMR spectra of maltol and ethyl maltol- α -glucoside

	Maltol (CDCl_3)	Maltol-G (D_2O)	Ethyl maltol (CDCl_3)	Ethyl maltol-G (D_2O)
C-2	149.50	141.44	153.74	142.49
C-3	144.89	162.22	144.22	167.77
C-4	173.67	176.19	174.02	177.89
C-5	114.37	114.83	114.28	116.22
C-6	153.99	155.76	154.14	157.66
C-7	14.77	14.18	21.80	22.77
C-8	-	-	11.11	10.96
C-1'		100.12		102.28
C-2'		71.95		73.63
C-3'		72.83		74.50
C-4'		68.13		69.66
C-5'		70.49		72.11
C-6'		59.41		60.96

Ethyl maltol- α -glucoside의 분리 및 구조동정

Ethyl maltol과 dextrin 존재하에서 *B. stearothermophilus* CGTase의 반응액으로부터 maltol에서와 동일한 조건으로 분리하여 무색 시럽상의 반응생성물 0.43 g을 얻었으며, 이 역시 여러 용매조건에서 결정화를 시도하였으나 결정이 생성되지 않았다. 생성물의 positive FAB-MS (m/z) 분석 결

과 $325 [\text{M}+\text{Na}]^+$ 로 나타나 분자량이 302임을 알 수 있었으며, ^1H NMR 측정결과 8.07 (d, 1H, $J = 5.58$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 6.53 (d, 1H, $J = 5.58$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$), 2.85 (q, 2H, $J = 7.62$ Hz, CH_2), 1.24 (t, 3H, $J = 7.65$, CH_3)에서 proton signal이 검출되어 ethyl maltol의 존재가 시사되었다. 또한 5.44 (d, 1H, $J = 3.73$ Hz, anomeric H), 4.07-3.49 (glucosyl moieties)에 기인하여 비당부에 glucose 1분자가 결합되어 있는 것으로 시사되었는데, 특히 anomeric proton의 coupling constant (J)가 3.73 Hz이었으므로 이 역시 α -anomer임을 알 수 있었다. ^{13}C -NMR에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 비당부의 chemical shifts가 ethyl maltol이고 여기에 glucose 1분자가 결합되어 있음을 알 수 있었으며, α -glucosidase를 반응시켰을 때 ethyl maltol이 생성되는 것으로 보아 ethyl maltol의 반응액으로부터 분리한 생성물은 ethyl maltol- α -D-glucoside로 동정되었는데 두 종의 당 전이 생성물의 구조는 Fig. 2와 같다.

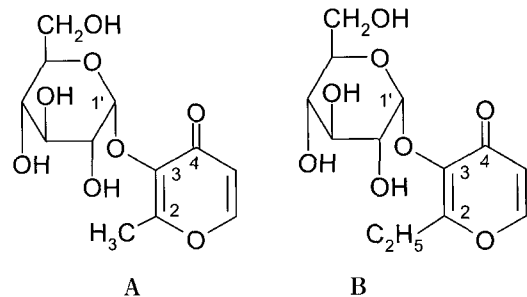


Fig. 2. Proposed structures of the transglycosylation products

- A: Maltol- α -D-glucoside,
- B: Ethyl maltol- α -D-glucoside.

한편 2종의 생성물에 대한 UV profile을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 메탄올과 0.1 M HCl 수용액에서 maltol의 최대 흡수파장 (λ_{max})이 각각 278 nm과 274 nm 인데 비하여 당 전이 생성물의 최대 흡수파장은 각각 258 nm, 260 nm로 단파장 쪽으로 이동하였고, ethyl maltol의 반응액으로부터 분리한 당 전이 생성물의 경우도 maltol의 경우와

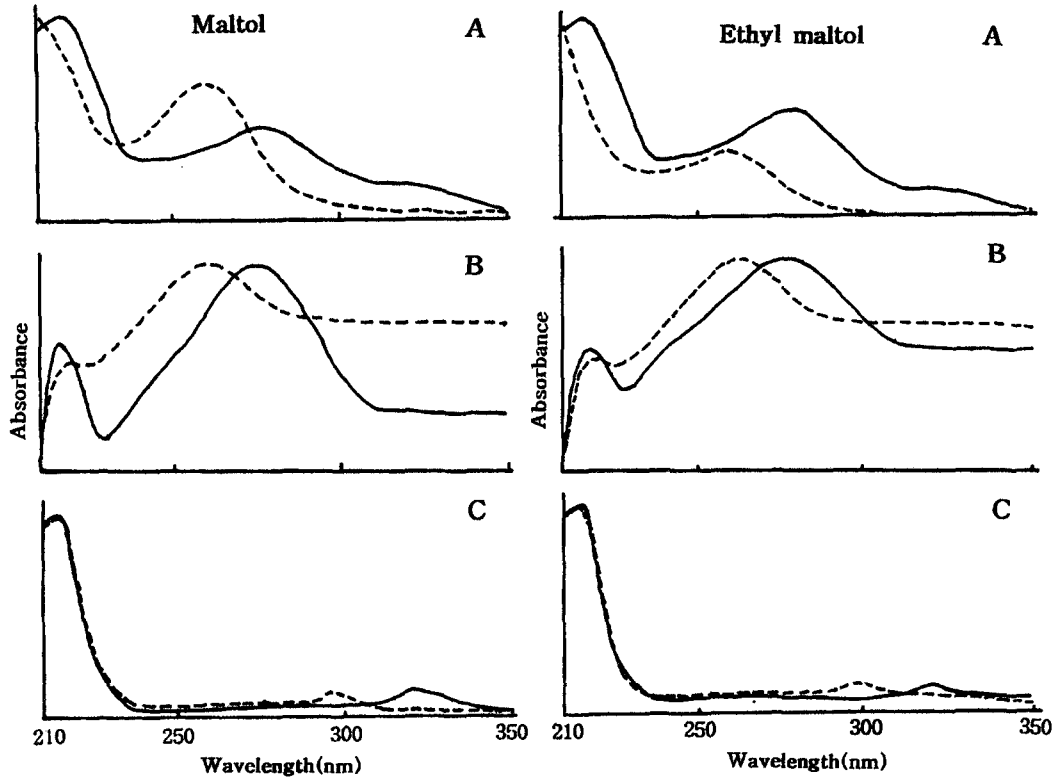


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of maltol, ethyl maltol, maltol- α -D-glucoside and ethyl maltol- α -D-glucoside. —: Maltol or ethyl maltol, ---: maltol- α -glucoside or ethyl maltol- α -glucoside, A: MeOH, B: 0.1 M HCl, C: 0.1 M NaOH.

유사한 경향을 나타내었다. 이와 같은 당 전이 생성물들은 당이 결합되지 않은 상태의 maltol이나 ethyl maltol과는 달리 물에 자유롭게 녹으면서 향기가 거의 없었으나 이를 산 또는 α -glucosidase로 가수분해 할 경우는 가수분해되어 maltol과 ethyl maltol이 본래 지니는 고유의 향기가 생성되는 특성을 지니고 있었다.

결 론

식품 및 담배용 향료로 널리 사용되는 maltol과 ethyl maltol의 이화학성 개선을 목적으로 효소적 방법에 의한 배당체 합성을 시도하였다. 당 공여체로서 dextrin과 당 수용체로서 maltol 또는 ethyl

maltol을 함유하는 혼합액에 *Bacillus stearothermophilus* 또는 *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase를 첨가후 반응시킨 결과 maltol 또는 ethyl maltol monoglucoside 이외에도 maltooligoglucoside로 간주되는 수종의 반응 생성물이 검출되었다. 각각의 반응액은 *Rhizopus niveus* glucoamylase 처리후 Diaion-HP 칼럼 및 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 생성물을 분리한 다음 FAB-MS, UV, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 측정, 산 가수분해, α -glucosidase 및 β -glucosidase에 의한 가수분해 특성 조사결과 이들은 각각 maltol- α -D-glucoside와 ethyl maltol- α -D-glucoside인 것으로 판명되었다. 이들 배당체는 수용성이면서 향기가 전혀 없었으나 이를 산 또는

α -glucosidase로 가수분해시켰을 때 원래의 향기를 지닌 maltol과 ethyl maltol을 생성하였다.

참 고 문 헌

- Baba, N., N. Maeda, A. Ito, Y. Kishida, S. Nakajima, J. Iwasa and H. Miyawaki (1995) Synthesis of sugar and glycerophospholipid derivatives of sulfurol and maltol. *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)* 44; 23-29.
- Herron, B. N. C.(1989) Tobacco product containing side stream smoke flavorant. U. S. Patent 4,804,002.
- Ito, Y. (1972) Flavors of maltol and its related compounds. *Koryo* 102; 11-17.
- Kim, M. O. and W. Baltes (1996) On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 44; 282-289.
- Kim, Y. H., Y. G. Lee, G. J. Choi, K. Uchida and Y. Suzuki. (2001) Transglycosylation to ginseng saponins by cyclodextrin glucanotransferases. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65; 875-883.
- Kitahata, S. (1990) Synthesis of oligosaccharides using microbial enzymes. *Denpun Kagaku* 37; 59-67.
- Leblanc, D. T. and H. A. Akers (1989) Maltol and ethyl maltol. From the larch tree to successful food additive. *Food Technol.* April; 78-84.
- Muto, N. (2001) Formation of stable ascorbate derivative by α -glucosidase-catalyzed transglucosylation. *Nippon Nōgeigakaku Kaishi* 75; 569-572.
- Okada, S., S. Kitahata, M. Shiosaka, H. Bunya, M Kubota, S. Sakai and Y. Tsujisaka, (1991) Application of cyclodextrin glucanotransferase. *Denpun Kagaku* 38; 211-215.
- Suzuki, Y. and K. Suzuki (1991) Enzymatic formation of 4^G- α -D-glucopyranosyl-rutin. *Agric. Biol. Chem.* 55; 181-187.
- Yaylayan, V. A. and S. Mandeville (1994) Stereochemical control of maltol formation in Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 42; 771-775.
- Yamamoto, I. (1989) A stable form of ascorbate, 2-O- α -glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *Kagaku to Seibutsu* 29; 726-733.
- 藤田智之, 中山充 (1992) モノテルペン配糖体. 日本特開平 4-300889.
- 二宮正紀, 鈴木博司, 篠崎靖宏, 松崎敏明 (1992) たばこ香嗅味改良剤. 日本特願平 4-57192.
- 鈴木幸雄, 内田綱 (1991) 生理活性物質の配糖化とその有用性. 科學と工業 65; 265-274.