

효소적 방법에 의한 Vanillin- α -Glucoside 및 Ethyl Vanillin- α -Glucoside의 합성

김삼곤 · 김근수 · 나도영 · 김영희*
KT&G중앙연구원
(2003년 11월 17일 접수)

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

Sam-Kon Kim, Kun-Soo Kim, Do-Young Ra and Young-Hoi Kim*
KT&G Central Research Institute
(Received November 17, 2003)

ABSTRACT : Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from *Bacillus stearotherophilus* synthesized vanillin and ethyl vanillin monoglucoside, with a series of its maltooligoglucosides by transglycosylation with dextrin as a donor, and vanillin or ethyl vanillin as an acceptor. The monoglucoside formed from reaction mixture of vanillin or ethyl vanillin by the successive actions of CGTase and *Rhizopus* glucoamylase was isolated by extraction with *n*-butanol saturated with water and silica gel column chromatography. The structure of the isolated monoglucoside was identified as vanillin- α -D-glucoside and ethyl vanillin- α -D-glucoside, respectively, by FAB-MS, UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectra and products by hydrolysis with acid, α - and β -glucosidases.

Key words : vanillin, ethyl vanillin, CGTase, transglycosylation, α -glucoside

Vanillin(4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)은 바닐라 특유의 향기(sweet, creamy and vanilla-like odor)를 가진 물질로써 식품, 향장품, 담배용 향료 제조에서 보류제, 변조제, 조화제 등으로 광범위하게 사용되는데 바닐린 소비량의 약 60%는 식품, 제과, 음료용으로 사용되고, 약 30%는 향장품, 그리고 약 7%는 약용으로 사용되고 있다(Priefert *et al.*, 2001). Vanillin의 세계적인 생산량은 연간

12,000톤 정도로 대부분이 화학적으로 합성된 것이고 천연 vanillin은 전체 생산량의 1% 미만이다(Li and Rosazza, 2000; Walton *et al.*, 2003). 천연 vanillin은 바닐라 콩(*Vanilla planifolia* Andrews 또는 *V. tahitensis* J. W. Moore)으로부터 생산되는데 원래 신선한 바닐라 콩에는 유리형태(free form)의 vanillin은 함유되어 있지 않고 당과 결합된 배당체의 형태로 존재하면서 바닐라 콩을 수확

*연락처 : 305-805 대진광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea (phone: 82-42-866-5460; fax: 82-42-866-5467; e-mail: yhkim@ktng.com)

후 발효, 숙성하는 과정에서 배당체 가수분해 효소인 β -glucosidase에 의해 가수분해되어 유리형태의 vanillin이 생성되는 것으로 알려져 있다 (Leong *et al.*, 1989; Voisine *et al.*, 1995). 또한 ethyl vanillin(3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde)은 현재까지 천연에서는 발견되지 않은 물질로 vanillin과 유사한 향기 특성을 가지고 있으면서 vanillin에 비해 향 강도가 4배정도 강하여 vanillin의 대체제로 널리 사용되고 있다(Arctander, 1969). Vanillin과 ethyl vanillin은 유기용매에는 자유롭게 용해되나 물에는 약 1% 밖에 녹지 않고 과도한 수분이나 공기와 접촉시 서서히 산화되거나 변색되는 단점이 있다(Arctander, 1969). 또한 vanillin은 승화성이 있어 이를 첨가한 후 고온에서 열처리하거나 제품을 제조한 후 저장 또는 유통과정중에 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; de Roode *et al.*, 2003). 또한 제조담배와 관련해서는 잎담배에 함유되어 있는 배당체들이 흡연과정중에 가수분해되어 smoke aroma를 개선시키거나 권련지에 배당체를 첨가하여 담배 부류연의 향 개선제(side stream smoke flavorant)로서 활용성이 검토된 바 있다 (Anderson *et al.*, 1976; Heckman *et al.*, 1981; Herron, 1989; Cai *et al.*, 2002). 그러나 화학적 방법에 의한 배당체 제조방법들은 여러 단계의 화학적 반응을 거쳐야 하고 유독성의 무기 촉매제를 사용해야 하는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하는 방법으로 최근에는 당 전이(transglycosylation) 활성을 지닌 효소를 이용하여 효소적 방법으로 배당체를 제조하려는 시도가 많이 이루어 졌으며, 특히 cyclodextrin glucanotransferase [1,4- α -D-glucan 4- α -D-(1,4-glucano)-transferase, cyclizing; CGTase, EC 2.4.1.19]의 경우 원래 cyclodextrin을 제조하는데 사용되는 효소이나 최근에는 이 효

소가 지니고 있는 당 전이활성을 이용하여 배당체를 제조함으로써 용해성, 산화안정성 및 맛의 질 개선이나 새로운 기능을 부여하기 위한 연구가 시도된 바 있다(Yamamoto, 1989; Okada *et al.*, 1991; Muto, 2001; Kim *et al.*, 2002).

따라서 본 연구에서는 vanillin과 ethyl vanillin의 물에 대한 용해성과 열에 대한 안정성을 개선할 목적으로 CGTase가 지니고 있는 당 전이활성을 이용하여 vanillin 및 ethyl vanillin의 배당체 합성을 시도한 바 그 결과를 보고코자 한다.

재료 및 방법

재 료

Vanillin, ethyl vanillin, rice α -glucosidase (G-9259) 및 bitter almond β -glucosidase는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 효소로써 *Bacillus(B) stearothermophilus*에서 분리한 CGTase와 dextrin(DE #18)은 일본 Hayashibara사(Okayama, Japan) 생물과학연구소로부터 분양받아 사용하였고, *B. macerans*에서 분리한 CGTase는 일본 Amano 제약(Osaka, Japan)으로부터 분양받아 사용하였다. *Rhizopus niveus* glucoamylase는 일본 생화학공업(Tokyo, Japan) 제품을 구입하여 사용하였고, silica gel (70-230 mesh)은 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다.

사용기기

HPTLC는 스위스 Camag사의 Linomat IV HPTLC와 TLC scanner를 사용하였고, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz) spectra는 Bruker사의 AMX 500을 사용하여 측정하였다. Ultraviolet(UV) absorption spectra는 Beckman사의 DU-70 spectrophotometer, infrared(IR) absorption spectra는 Hitachi 260-30 spectrophotometer를 사용하였고, 분자량 측정을 위한 FAB-MS는 JEOL JMS HX-110A(Tokyo, Japan)를 사용하였다.

CGTase의 활성 측정

CGTase 활성은 Suzuki 등의 방법(Suzuki and Suzuki, 1991)에 준하여 측정하였다.

Vanillin 및 ethyl vanillin 배당체의 제조

당 수용체로서 vanillin 또는 ethyl vanillin 2 g 과 당 공여체인 dextrin(DE #18) 5 g에 0.1 M CaCl₂ 용액 1.0 mL와 0.1 M 초산완충용액(pH 6.0)을 가하여 각각 100 mL로 한 다음 vanillin과 ethyl vanillin을 충분히 용해시키기 위하여 80°C에서 10분간 가열하였다. 각각의 가열액은 실온으로 냉각한 다음 *B. stearothermophilus* CGTase(1,125 U)를 가하고 50°C의 압소에서 교반하면서 48시간 반응시켰다. 반응액은 비등 수욕조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 다음 실온으로 냉각하고 반응액중 0.5 mL씩을 취하여 HPTLC 분석용 시료로 사용하였다. 나머지 반응액은 4.0 M 초산 용액으로 pH 4.5로 조정 후 glucoamylase(9.0 U)를 가하여 50°C에서 7시간 반응시킨 다음 위에서와 동일한 방법으로 효소를 불활성화시켰다. 이어서 각각의 반응액은 chloroform으로 추출하여 미반응의 vanillin과 ethyl vanillin을 제거하고 수용액 층은 수포화 butanol로 수회 추출한 다음 감압 농축하여 분말상의 생성물을 얻었다. 생성물은 다시 silica gel 칼럼 크로마토그래피에서 용매로 chloroform과 methanol 혼합액(8:2, v/v)을 사용하여 분리한 다음 ethanol 또는 ethanol과 acetone 혼합액으로 재결정화하여 vanillin의 반응액으로 부터는 무색 분말상의 생성물(I) 0.66 g, ethyl vanillin의 반응액으로 부터는 무색 분말상의 생성물(II) 0.42 g을 얻었다.

생성물 I (reaction product from vanillin): colorless needles(absolute ethanol); mp: 186-188°C; FAB-MS(m/z): 337 [M+Na]⁺; UV_{max}: 236, 274 nm; IR ν_{max}(KBr): 3350, 2925, 1690, 1590 cm⁻¹; ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD): δ 9.84(s, 1H), 7.55-7.50(m, 2H), 7.41(d, 1H, J=8.2 Hz), 5.67(d, 1H, J=3.58 Hz), 3.94-3.86 (dd, 1H, J=12.3, 2.2 Hz), 3.92(s, 3H), 3.70-3.58(m, 4H); ¹³C-NMR(126 MHz, CD₃OD): Table 2.

생성물 II (reaction product from ethyl vanillin): colorless needles(ethanol-acetone), mp: 177-

179°C; FAB-MS(m/z): 351 [M+Na]⁺; UV_{max}: 237, 275 nm; IR ν_{max}(KBr): 3350, 2925, 1690, 1590 cm⁻¹; ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD): δ 9.83(s, 1H), 7.40(2H, m), 7.53-7.48(m, 1H), 7.40(d, 1H, J=8.1 Hz), 5.66(d, 1H, J=3.60 Hz), 4.16(d, 1H, J=7.0 Hz), 4.14(d, 1H, J=7.0 Hz) 3.51-3.42(m, 5H), 1.45(t, 3H, J=7.0 Hz); ¹³C-NMR(126 MHz, CD₃OD): Table 2.

당 전이수를 측정

각각의 반응액 0.5mL에 methanol을 가하여 3 배로 희석한 다음 전개용매로서 n-butanol:acetic acid:water(3:1:1, v/v) 혼합액을 사용하여 HPTLC로 분리한 후 scanner로 270 nm에서 각 peak의 면적을 측정하여 당 전이(transglycosylation) 수율로 하였다.

결과 및 고찰

CGTase에 의한 유도체의 생성

식물에 존재하는 향기를 가진 성분들 중 분자내에 알코올기를 가진 많은 성분들 중에는 당류와 결합된 배당체의 형태로 존재한다는 것이 잘 알려져 있다(Stahl-Biskup *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1993). Vanillin의 경우도 신선한 바닐라 콩에서는 당류와 결합된 배당체로 존재한다는 것이 이미 알려져 있다(Leong *et al.*, 1989; Voisine *et al.*, 1995). 본 실험에서 각종 기능성 물질 제조연구에 자주 이용되는 CGTase의 당 전이활성을 이용하여 vanillin 및 ethyl vanillin의 배당체 제조를 시도하였다. 당 공여체로서 dextrin과 당 수용체로서 vanillin 또는 ethyl vanillin의 혼합액에 서로 다른 미생물에서 유래하는 2종의 CGTase를 사용하여 실험한 결과 *B. stearothermophilus*에서 유래하는 CGTase에 의해서는 TLC 상에서 vanillin 또는 ethyl vanillin 보다 R_f 값이 낮은 수종의 반응 생성물이 생성되었으나 *B. marcerans* CGTase에 의해서는 당 전이 생성물이 검출되지 않았다. 그 중 dextrin과 vanillin 또는 ethyl vanillin의 존재하에서 *B. stearothermophilus* CGTase에 의한 반응액을 HPTLC로 분석한 결과는 Fig. 1과 같으며, 이

를 scanner를 이용하여 270 nm에서 각 peak의 면적을 측정하여 백분율로 표시한 결과는 Table 1과 같다.

Vanillin과 dextrin의 혼합액에 *B. stearothermophilus* CGTase를 반응시켰을 때 반응이 일어나지 않은 vanillin 이외에도 vanillin에 당류로

서 glucose가 1개에서 6개까지 결합된 배당체가 생성되었으며, ethyl vanillin과 dextrin의 반응액에서도 glucose가 1개에서 5개까지 결합된 배당체가 생성되었다. 당 전이율은 vanillin에서 약 47.3%, ethyl vanillin에서 약 33.0%로서 vanillin에 비해 ethyl vanillin에서 당 전이율이 낮은 원인은 두 성

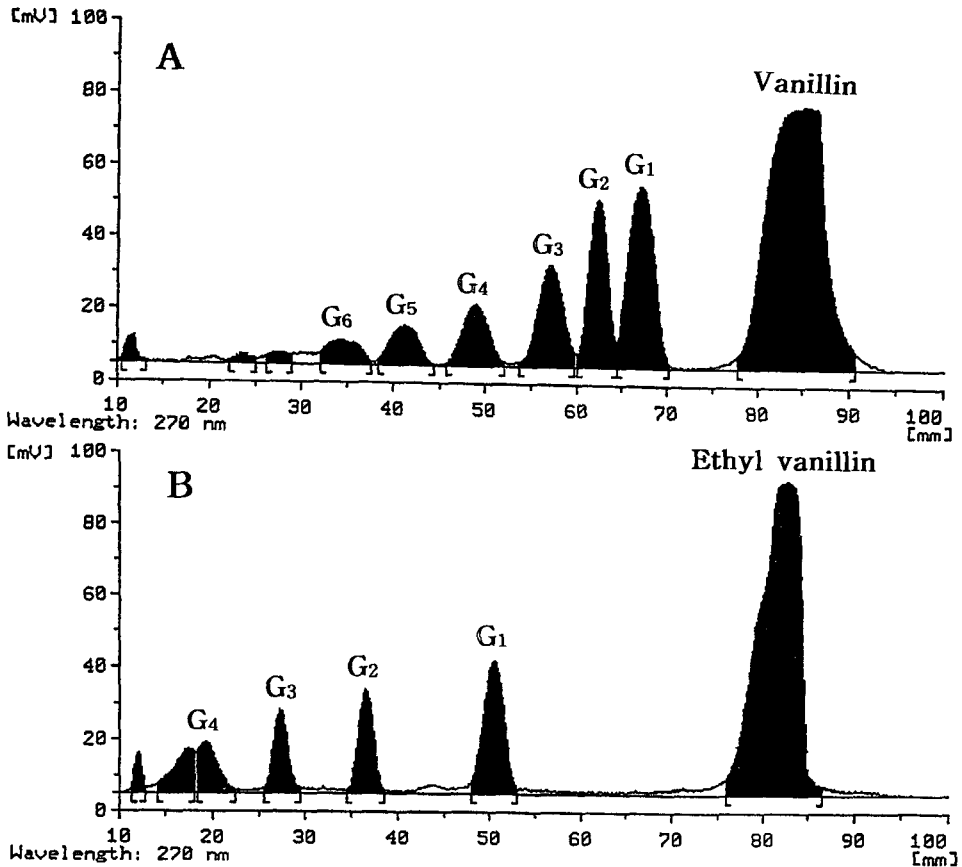


Fig. 1. HPTLC chromatograms of the reaction mixtures of dextrin and vanillin (A) or ethyl vanillin (B) with *B. stearothermophilus* CGTase.

G₁: monoglucoside-like, G₂: maltoside-like, G₃-G₆: maltooligoside-like compounds.

B. stearothermophilus CGTase (225 U) was incubated at 50°C for 48 hr in the dark with a mixture of dextrin (0.5 g) and vanillin or ethyl vanillin (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 (3:1:1, v/v), and each peaks were scanned under UV irradiation (270 nm).

Table 1. Ratio(%) of transglycosylation to vanillin and ethyl vanillin from dextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*

| Acceptors | A | A-G ₁ | A-G ₂ | A-G ₃ | A-G ₄ | A-G ₅ | A-G ₆ |
|----------------|------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Vanillin | 52.7 | 16.0 | 10.9 | 8.5 | 5.4 | 3.7 | 2.7 |
| Ethyl vanillin | 67.0 | 14.0 | 7.9 | 6.1 | 4.9 | - | - |

* A: Unreacted acceptors.

* A-G₁, A-G₂, A-G₃, A-G₄, A-G₅, and A-G₆ are calculated tentatively as α -monoglucoside, α -maltoside, α -maltotriose, α -maltotetraose, α -maltopentaose and α -maltohexaose, respectively.

* Each reaction mixture was incubated with CGTase as described in materials and methods, and then a small amount of the reaction mixture was removed to be examined by HPTLC. The ratio of transglycosylation was scanned under irradiation of UV (270 nm).

분의 물에 대한 용해성의 차이에 기인할 것으로 판단된다. CGTase에 의한 당 전이반응이 일어나기 위해서는 우선적으로 당 공여체와 당 수용체가 물에 용해되어야 하며, 특히 당 수용체의 용해성을 높이기 위해 분자내에 알코올기를 지니고 있지 않은 지용성 유기용매와 물의 혼합액을 사용하기도 한다(Suzuki and Suzuki, 1991). 또한 각각의 반응액에 glucoamylase를 처리한 결과 vanillin 또는 ethyl vanillin oligosaccharides(G₂-G₆)로 간주되는 성분들은 대부분 감소한 반면 monosaccharide(G₁)로 간주되는 성분은 증가하였다. 이러한 결과는 CGTase가 dextrin의 가수분해 과정에서 생성된 α -glucosyl 잔사를 당 수용체인 vanillin 또는 ethyl vanillin에 전이시킴으로써 vanillin 또는 ethyl vanillin oligosaccharides를 생성함을 나타내 주고 있다.

생성물의 분리 및 구조동정

Vanillin과의 반응액에서 분리한 생성물(I)을 positive FAB-MS(m/z)로 분석한 결과 질량이 337 [M+Na]⁺로 분자량이 314임을 알 수 있으며, IR spectrum에서 hydroxyl기(3350 cm⁻¹), aldehyde C-H(2925 cm⁻¹), conjugated aldehyde carbonyl (1690 cm⁻¹), aromatic C=C(1590 cm⁻¹)의 존재가 확인되었다. 또한 ¹H-NMR spectrum(CD₃OD)에서

δ 9.84(s, 1H)에서 aldehydic proton signal, δ 7.55-7.50(m, 2H)에서 aromatic proton signal, δ 7.42(d, 1H, J=8.2 Hz)에서 glycosidic linkage의 aromatic proton signal, δ 5.67(d, 1H, J=3.58)에서 anomeric proton signal, δ 3.92(s, 3H)에서 methoxyl의 proton signal 및 δ 3.70-3.58(m, 4H)에서 glucosyl기의 proton signal이 관측되어 vanillin에 glucose 1 분자가 결합된 화합물임을 알 수 있으며, 특히 anomeric proton의 coupling constant(J)가 3.58 Hz 인 것으로 보아 생성물이 α -anomer임을 알 수 있었다. 또한 ¹³C-NMR(126 MHz, CD₃OD)에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 14개의 carbon signal이 검출되었는데 δ 149.4-109.9 사이에서 관측된 6개의 signal은 vanillin의 aromatic group에 기인한 것이고, δ 193.4와 δ 54.5는 각각 vanillin의 aldehyde기와 methoxyl기, 그리고 δ 96.0-58.7 사이에서 glucosyl기에 기인한 6개의 carbon signal이 관측되어 생성물 I은 Fig. 2에서 보는바와 같이 vanillin에 glucose 1 분자가 결합된 vanillin- α -D-glucoside(4-formyl-2-methoxyphenyl-O- α -D-glucopyranoside)인 것으로 확인되었다.

Ethyl vanillin과의 반응액에서 분리한 생성물(II)은 positive FAB-MS (m/z)로 분석한 결과 질량이 351 [M+Na]⁺로 나타나 분자량이 328임을

알 수 있었으며, IR spectrum에서는 vanillin에서와 같이 hydroxyl기(3390 cm^{-1}), aldehyde C-H(2934 cm^{-1}), conjugated aldehyde carbonyl(1695 cm^{-1}),

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

| Carbon number | Vanillin- α -glucoside | Ethyl vanillin- α -glucoside |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Aglycone moiety | | |
| 1 | 149.4 | 153.4 |
| 2 | 148.1 | 151.5 |
| 3 | 114.7 | 118.5 |
| 4 | 129.5 | 133.3 |
| 5 | 125.2 | 126.7 |
| 6 | 109.9 | 113.8 |
| 7 | 54.5 | 66.1 |
| 8 | 193.3 | 15.1 |
| 9 | - | 193.1 |
| Glucose moiety | | |
| 1' | 96.0 | 100.0 |
| 2' | 69.8 | 73.5 |
| 3' | 71.4 | 75.1 |
| 4' | 67.7 | 71.3 |
| 5' | 71.3 | 74.9 |
| 6' | 58.7 | 62.3 |

aromatic C=C(1601 cm^{-1})의 존재가 시사되었다. 또한 ^1H -NMR spectrum(CD_3OD)에서 δ 9.83(s, 1H)에서 aldehydic proton signal, δ 7.53-7.48(m, 2H)에서 aromatic proton signal, δ 7.40(d, 1H, $J=8.1\text{ Hz}$)에서 glycosidic linkage의 aromatic proton signal, δ 5.66(d, 1H, $J=3.60\text{ Hz}$)에서 anomeric proton signal, δ 4.16(d, 1H, $J=7.0\text{ Hz}$)과 δ 4.14(d, 1H, $J=7.0\text{ Hz}$)에서 ethoxyl기의 methylene proton signal이 관측되었다. 또한 δ 3.51-3.42(m, 4H)에서 glucosyl기의 proton signal 및 δ 1.45(t, 3H, $J=7.0\text{ Hz}$)에서 ethoxyl기의 methyl proton signal이 관측되어 이 성분은 ethyl vanillin에 glucose 1 분자가 결합된 화합물임을 알 수 있으며, anomeric proton의 coupling constant (J)가 3.68 Hz 인 것으로 보아 이 성분 역시 α -anomer임을 알 수 있었다. 또한 ^{13}C -NMR (126MHz, CD_3OD)에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 15개의 carbon signal이 관측되었는데 δ 153.4-113.8에서 6개의 signal은 ethyl vanillin의 aromatic group에 기인한 것이고, δ 193.4와 66.1 및 15.1은 각각 ethyl vanillin의 aldehyde기와 ethoxyl기 중의 methylene과 methyl기에 기인한 것이다. 또한 δ 100.0-62.3 사이에서 glucosyl기에 기인한 6개의 carbon signal이 관측되어 생성물 II는 Fig. 2에서 보는바와 같이 ethyl vanillin에 glucose 1 분자가 결합된 ethyl vanillin- α -D-glucoside(4-formyl-2-

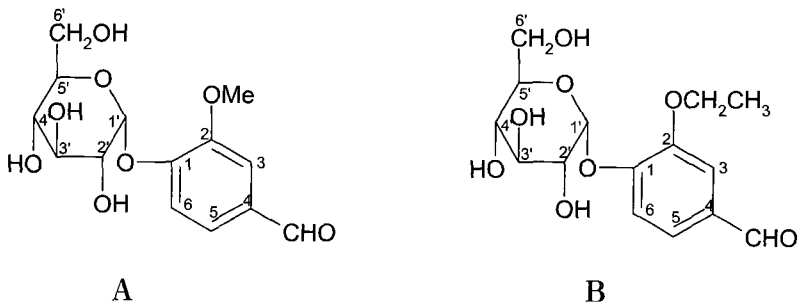


Fig. 2. Proposed structures of the transglycosylation products.
A: Vanillin- α -D-glucoside, B: Ethyl vanillin- α -D-glucoside.

ethoxyphenyl-*O*- α -D-glucopyranoside)인 것으로 확인되었다.

Vanillin과 ethyl vanillin은 특유의 향기를 가지면서 물에 약 1% 정도가 용해되나(Arctander, 1969) 본 실험에서 제조된 당 전이생성물은 물에 자유롭게 녹으면서 향기를 지니고 있지 않았으며, 이를 β -glucosidase로 가수분해했을 때에는 분해가 되지 않았으나 산 또는 α -glucosidase로 가수분해 할 경우는 가수분해되어 vanillin과 ethyl vanillin이 본래 지니는 고유의 향기가 생성되는 특성을 지니고 있었다.

결 론

식품 및 담배용 향료로 널리 사용되는 vanillin과 ethyl vanillin의 물에 대한 용해성과 열에 대한 안정성을 개선할 목적으로 효소적 방법에 의한 배당체 합성을 시도하였다. 당 공여체로서 dextrin과 당 수용체로서 vanillin 또는 ethyl vanillin을 함유하는 혼합액에 *Bacillus stearothermophilus*에서 유래하는 cyclodextrin glucanotransferase를 첨가후 반응시킨 결과 vanillin 또는 ethyl vanillin monoglucoside 이외에도 maltooligoglucoside로 간주되는 수종의 반응 생성물이 검출되었다. 각각의 반응액은 *Rhizopus neyius* glucoamylase 처리후 수포화 부탄올 추출 및 silica gel 칼럼 크로마토그래피에 의해 생성물을 분리한 다음 FAB-MS, UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 측정, 산 가수분해, α -glucosidase 및 β -glucosidase에 의한 가수분해 특성 조사결과 이들은 각각 vanillin- α -D-glucoside와 ethyl vanillin- α -D-glucoside인 것으로 판명되었다. 이들 배당체는 수용성이면서 향기가 전혀 없었으나 이를 산 또는 α -glucosidase로 가수분해시켰을 때 원래의 향기를 지닌 vanillin과 ethyl vanillin을 생성하였다.

참 고 문 헌

Anderson, R. C., Gunn, D. M. and Gibson, J. A. (1978) Great Britan Patent 1508616.
Arctander, S. (1969) Perfume and Flavor Che-

micals(Aroma Chemical). Det Hoffensbergske Etablissement. Copenhagen. Denmark.

- Cai, J., Liu, B., Ling, P. and Su, Q. (2002) Analysis of free and bound volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in uncased and cased tobaccos. *J. Chromatogr.* 947: 267-275.
- Heckman, R. A., Dube, M. F., Lym, D. and Rivers, J. M. (1981) The role of tobacco precursors in cigarette flavor. *Res Adv. Tob. Sci.* 7: 107-153.
- Herron, B. N. C. (1989) Tobacco product containing side stream smoke flavorant. U. S. Patent 4,804,002.
- Kim, S. K., Kim, K. S. and Kim, Y. H. (2002) Enzymatic synthesis of maltol- α -glucoside and ethyl maltol- α -glucoside. *J. Kor. Soc. Tob. Sci.* 24: 94-100.
- Leong, G., Archavlis, A. and Derbesy, M. (1989) Research on the glucoside fraction of the vanilla bean. *J. Ess. Oil Res.* 1: 33-41.
- Li, T. and Rosazza, J. P. N. (2000) Biocatalytic synthesis of vanillin. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 684-687.
- Muto, N. (2001) Formation of stable ascorbate derivative by α -glucosidase-catalyzed transglucosylation. *Nippon Nōgeigakaku Kaishi* 75: 569-572.
- Okada, S., Kitahata, S., Shiosaka, M., Bunya, H., Kubota, M., Sakai, S. and Tsujisaka, Y. (1991) Application of cyclodextrin glucanotransferase. *Denpun Kagaku* 38: 211-215.
- Priefert, H., Rabenhorst, J. and Steinbüchel, A. (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 56: 296-314.
- de Roode, B. M., Franssen, M. C. R., van der Padt, A. and Boom, R. M. (2003) Perspectives for industrial enzymatic production of glycosides. *Biotechnol. Prog.* 19:

- 1391-1402.
- Stahl-Biskup, E., Intert, F., Holthuijzen, J., Stengele, M. and Schulz, G. (1993) Glycosidically bound volatiles-A review 1986-1991. *Flavour Fragr. J.* 8: 61-80.
- Suzuki, Y. and Suzuki, K. (1991) Enzymatic formation of 4^G- α -D-glucopyranosyl-rutin. *Agric. Biol. Chem.* 55: 181-187.
- Voisine, R., Carmichael, L., Chalier, P., Cormier, F. and Morin, A. (1995) Determination of glucovanillin and vanillin in cured vanilla pods. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2658-2661.
- Walton, N. J., Mayer, M. J. and Narbad, A. (2003) Vanillin. *Phytochemistry* 63: 505-515.
- Watanabe, N., Watanabe, S., Nakajima, R., Moon, J. H., Shimokihara, K., Inagaki, J., Etoh, H., Asai, T., Sakata, K. and Ina, K. (1993) Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzyme action during flower opening. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1101-1106.
- 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) たばこ香喫味改良剤. 日本特願平 4-57192.