

단 신

미생물을 이용한 Hydroxytyrosol의 부위선택적 Glycosylation

배철만 · 임현정 · 안용현*

단국대학교 화학과

(2003. 12. 2 접수)

Microbial Approach to the Regioselective Glycosylation of Hydroxytyrosol

Cheolman Bae, Hyunjeung Lim, and Yonghyun Ahn*

Department of Chemistry, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

(Received December 2, 2003)

주제어: 하이드록시타이로솔, 글루코실레이션, 페놀 글루코시드, *S. mutans*

Keywords: Hydroxytyrosol, Glycosylation, Biophenolic Glycosides, *S. mutans*

서 론

식물들은 다양한 이유로 페놀유도체를 생합성하는데 가장 근원적인 이유는 스트레스에 기인한다. 식물체의 페놀화합물들은 anti-bacterial, anti-viral 그리고 anti-fungal기능을 가지고 있다. 또한 산화과정이 진행됨에 따라 손상된 세포벽에 lignification에 필요한 물질을 공급하여 치유하는 기능도 페놀화합물이 수행한다. 페놀화합물의 glycosylated된 형태는 상대적으로 삼투압에 비활성적이고 곤충약탈자(insect predators)에게 바람직하지 않은 탄수화물로 저장하는데 매개체로서의 기능도 한다.¹

Biophenolic glucosides는 전형적인 식물체의 2차 대사물질이며 다양하게 분포되어져 있다. 최근 소비품에서 2종류의 biophenolic glucosides가 분리되어졌으며² 이러한 유도체들은 특히 올리브 잎 또는 열매에 또한 많이 존재한다. Biophenolic glucosides의 미량성분들은 올리브오일의 품질을 좌우한다. Biophenols은 metal chelation 또는 자유라디칼 소멸을 통하여 항산화작용을 한다.³ Hydroxytyrosol의 생물학적 그리고 약리학적 특성에 최근 많은 관심을 갖게 되었다.⁴ 왜냐하면 hydroxytyrosol과 이들의 유도체들이 지중해지역의 심장질환 및 암의 감소에 밀접하게 관련된 것으로 보고되

여지고 있기 때문이다.⁵

올리브기름에서 분리된 hydroxytyrosol의 glycosylation된 경향은 nonregioselective한 효소의 작용으로 보이며 (Fig. 1) 이러한 배경은 항산화기능의 수월한 수행과 용해도를 증가시켜 식물체내에서 높은 유효성을 부여하기 때문이다.⁶ 본연구에서는 식물체에서 생합성되며 유용한 약리효과를 나타내는 hydroxytyrosol에 미생물을 이용한 생변환을 통해 glycosylation되는 것을 고찰하였다.

실 험

시약 및 분석기기

합성에 사용된 시약은 Aldrich사의 제품을 이용하였고 화합물의 분리에 이용된 용매는 시약급을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. TLC 판(60 F₂₅₄)은 Merck사 제품을 사용하였으며 column chromatography는 silica

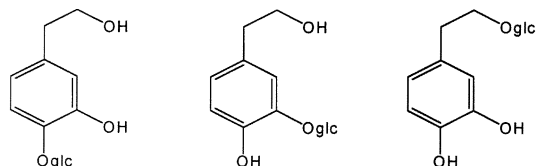


Fig. 1. Glucosides of the hydroxytyrosol.

gel(230-400 mesh)를 사용하였다. ^1H NMR은 Varian Gemini 200 또는 400 NMR spectrometer(Bruker)를 사용하여 얻었다. LC-MS는 HP-1100 HPLC-QUATRO LC Triple Qadrupole MS를 이용하여 얻었다 이때 사용한 컬럼은 μ -bondapak C_{18} column. 용매로는 MeOH:H₂O gradient를 이용하였다. BHI배지는 Difco사에서 구입하였고 *Streptococcus mutans*는 KCTC에서 분양받았다.

3,4-dihydroxyphenylacetic acid의 에스테르화

40% KOH 수용액 20 ml와 ethyl ether 30 ml의 혼합 용액에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 3 g을 조금씩 첨가 한 후 0°C를 유지하면서 교반한다. 생성된 diazomethane을 포함한 에테르층을 신속하게 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(1 g, 5.95 mmol)가 녹아있는 메탄올 20 ml에 0°C에서 교반하면서 10분간 첨가한다. 0°C에서 교반하면서 약 15-20분 지난후 반응의 완결징도를 TLC(n-Hexane: Ethyl Acetate=6:4, R_f =0.5)로 확인한 후 용매는 감압하에서 제거한다. Silica gel column chromatography(n-Hexane: Ethyl Acetate=7:3, R_f =0.3)로 순수한 methyl 3,4-dihydroxyphenylacetate를 680 mg(수득율 63.5%) 얻었다. ^1H NMR(CDCl_3): δ 3.46(s, 2H) 3.65(s, 3H) 6.25(bs, 1H) 6.58-6.80(m, 3H).

Hydroxytyrosol의 합성

환류냉각기가 부착된 100 mL 플라스크에 LiBH_4 (377 mg, 11.3 mmol)와 THF (15 mL)를 질소기체하에서 넣는다. Methyl 3,4-dihydroxyphenylacetate(680 mg, 3.78 mmol)가 녹아있는 5 ml의 THF 용액을 주사기로 질소기체하에서 5분간 가한후 12시간 환류시킨다. 과량의 LiBH_4 는 0.1N HCl용액을 가하여 분해시키고 반응용매는 감압하에서 제거한다. 용매를 제거후 남은 혼합물을 메탄올(10 mL)에 녹여서 5 g의 silica gel에 흡착시킨후 silica gel column chromatography(n-Hexane: Ethyl Acetate=4:6, R_f =0.4)로 정제하여 hydroxytyrosol를 250 mg(수득율 19.5%) 얻었다. ^1H NMR(D_2O): δ 2.55 (t, J =6.6Hz, 2H) 3.58 (t, J =6.6Hz, 2H) 6.50-6.71 (m, 3H).

*Streptococcus mutans*의 배양

보존 중인 균을 화염 멸균한 백금이틀 사용하여 100 ml의 BHI 액체 배지 안에 무균 이식하고 37°C, 200 rpm, 24 hr 동안 전배양하였다. 이렇게 *S. mutans*를 활성화시킨 전배양액을 동일한 조성의 200 ml의 BHI 액체배지를 함유한 5개의 500 mL baffie flask에 각각 10 ml를 집중한 후 37°C, 200 rpm에서 24 hr 동안 배양하였고, 이 배양액은 8000xg, 4°C에서 15분간 원심 분

리하여 whole cells을 얻었다. 이렇게 얻어진 whole cells은 5°C에서 보관하였고 적당량 생변환 반응에 사용하였다.

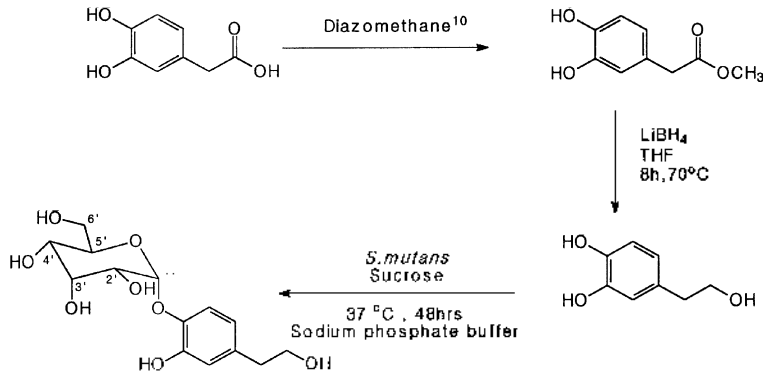
*Streptococcus mutans*를 이용한 생변환

50 ml 플라스크에 10 ml의 100 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 넣은 후 hydroxytyrosol(50.0 mg, 0.33 mM)과 sucrose(1.0 g)를 각각 가한다. 준비된 whole cell을 0.8 g(젖은상태) 넣은 후 37°C에서 200 rpm으로 48 hr 동안 교반하였다. 효소 반응의 진행은 TLC(Ethyl Acetate: MeOH=5:2, R_f =0.7)로 확인하였고 48시간 후 celite를 사용하여 cell들을 여과하여 제거한후 여액에 silica gel(3 g)를 넣고 감압 농축하여 흡착시킨후 silica gel column chromatography(Ethyl Acetate: MeOH=5:1, R_f =0.6)로 분리하여 부분정제된 hydroxytyrosol glucoside를 얻었다. 보다 정제된 화합물을 얻기 위하여 preperative TLC(Ethyl Acetate: MeOH=5:1)를 이용하여 3-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)phenyl-4-O- α -D-glucopyranoside을 10 mg(수득율 8.9%) 얻었다. (18 mg의 출발물질중 회수) LC-MS: m/z 339.1(M^+Na^+). ^1H NMR(D_2O , 400 MHz): δ 2.55(t, J =6.8Hz, 2H) 3.32(t, J =10Hz, 1H) 3.50-3.68(m, 6H) 3.76(t, J =11.6Hz, 1H) 5.37(d, J =3.6Hz, 1H) 6.59(dd, J =8.8Hz, 1.6Hz, 1H) 6.66(d, J =1.6Hz, 1H) 6.97(d, J =8.4Hz, 1H) ^{13}C NMR(D_2O , 100 MHz) 37.3, 60.9, 62.5, 69.4, 71.4, 72.6, 73.0, 98.2, 117.1, 117.4, 121.3, 134.8, 142.5, 145.6.

결과 및 고찰

효소들은 복잡한 탄수화물의 제조에 매우 유용한 도구로 사용되어왔고 정교한 protection deprotection 전략 없이도 glycosidic 결합의 유형을 결정하는 능력을 가지고 있다. 이러한 편리한 기능을 이용하여 glycosylation 실험을 진행하였다. 우선 생변환에 사용된 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol은 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid를 diazomethane으로 처리하여 에스테르를 얻은후 LiBH_4 로 환원시켜 얻었다.⁷

Streptococcus mutans(KCTC 3065; ATCC 25175)와 *Bacillus cereus*(KCTC 3624)를 이용하여 hydroxytyrosol의 glycosylation을 시도하였다. *Bacillus cereus*는 resveratrol의 C-3에 β -glycosidic 결합으로 glucose를 도입하는 것이 보고되어졌다.⁸ 이러한 *Bacillus cereus*의 whole cells를 이용하여 dextrose-enriched 인산완충용액에서 hydroxytyrosol



Scheme 1

에 glycosylation을 시도하였지만 반응이 진행되지 않았다. *Streptococcus mutans*: sucrose로부터 glucans를 생합성하는 미생물이다.⁹ Glucans는 치아를 포함한 고체 표면에 부착되는 접착력이 매우 높은 물질이다. *Streptococcus mutans*는 (-)-catechin의 C-4'의 hydroxy기에 glycosylation시켜 4'-O- α -D-glucopyranosyl(-)-catechin을 생합성한다. 이러한 특성을 이용하여 본연구에서도 hydroxytyrosol의 glucose를 도입하는 실험을 시도하였다. Seed culture를 24시간 배양한후 동일한 조성의 배양액을 사용하여 만든 production culture에서 48시간 배양하여 *Streptococcus mutans*의 whole cells을 얻었다. 이 whole cells를 2%의 sucrose를 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 가한후 hydroxytyrosol를 넣고 37 °C, 200 rpm에서 48시간 배양시킨다. Cells을 제거한 후 용액을 감압하에서 제거한다. 혼합용액(Ethyl Acetate: MeOH 5:1)과 silical gel column chromatography를 이용하여 생성물을 분리하였다. 부분정제된 화합물을 preparative TLC를 이용하여 생성물을 정제하였다. LC-MS를 이용하여 m/z 339.1에서 (M+Na)⁻의 peak를 확인하였다. 이 분자량의 생성물은 hydroxytyrosol에 glucose가 하나 결합된 물질로 확인된다. ¹H-NMR spectrum에서 2-(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol의 4위치의 hydroxy기에 α -glycosylated된 것을 확인하였다. 5.36 ppm에서 doublet($J=3.6$ Hz)으로 나타나는 피크는 α -glycosylated된 glucose의 C'-1에 hydrogen인 것으로 확인되었다. 쇠비름이나 olive oil에서 분리된 biphenolic glucoside들은 C'-1의 anomeric proton은 4.73 ppm에서 나타나며 이러한 것은 glycosidic 결합이 β -결합으로 이루어질 때 나타나기 때문이다.

올리브등의 식물체에서 nonregioselective하게 다양

한 위치에 glycosylation된 hydroxytyrosol의 혼합물이 얻어지는데 본 실험에서는 *S. mutans*의 whole cells를 이용하여 hydroxytyrosol의 C-4'의 hydroxy group에 regioselective 하게 glucose를 도입하였다.

이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

인용문헌

1. Miller, N. J.; Ruixlarrea, M. B. *J. Nutr. Environ. Medicine* **2002**, *12*, 39.
2. Seo, Y.; Shin, J.; Lee, B.; Lee, D. *J. Kor. Chem. Soc.* **2003**, *47*, 43.
3. (a) Saija, A.; Trombetta, D.; Tomaino, D.; Lo Cascio, R.; Princi, P.; Uccella, N.; Bonima, F.; Castelli, F. *Int. J. Pharm.* **1998**, *166*, 123. (b) Owen, R. W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Haubner, R.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H. *European J. Cancer* **2000**, *36*, 1235.
4. Visioli, F.; Galli, C. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4294.
5. (a) Tuck, K. L.; Hayball, P. J. *Nutritional Biochem.* **2002**, *13*, 636. (b) Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.; Binkoski, A. E.; Hilpert, K. E.; Griel, A. E.; Etherton, T. D. *The American J. Medicine* **2002**, *113*, 71.
6. Bianco, A.; Mazzei, R. A.; Melchioni, C.; Romeo, G.; Scarpati, M. L.; Soricco, A.; Uccella, N. *Food Chem.* **1998**, *63*, 461.
7. Bianco, A.; Passacantilli, P.; Righi, G. *Synthetic Communications* **1988**, *18*, 1765.
8. Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1313.
9. (a) Nakahara, K.; Kontani, M.; Ono, H.; Kodama, T.;

- Tanaka, T.; Ooshima, T.; Hamada, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 2768. (b) Shim, H.; Hong, W.; Ahn, Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*, inpress.
10. Fieser, L. F.; Fieser, M. "Reagent for Organic Synthesis" Vol. 1, 192, John Wiley & Son, Inc, 1967.
-