

대장균 베타-갈락토시데이즈를 이용하여 합성된 1, 2-Hexanediol Galactoside의 NMR Spectroscopy 및 Mass spectrometry

김이옥 · 이향렬 · 정경환[†]

한국교통대학교 생명공학과

(2016년 5월 16일 접수; 2016년 5월 24일 수정; 2016년 6월 16일 채택)

NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry of 1, 2-Hexanediol Galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -Galactosidase

Yi-Ok Kim · Hyang-Yeol Lee · Kyung-Hwan Jung[†]

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation,
Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Republic of Korea

(Received May 16, 2016; Revised May 24, 2016; Accepted June 16, 2016)

요약 : 화장품용 방부제로 사용하고 있는 1, 2-hexanediol (HD)에 높은 농도의 lactose (300 g/l)를 넣고, 재조합 대장균 β -galactosidase (β -gal)를 이용하여 galactose 한 분자를 결합시키는 transgalactosylation 반응을 시켜서, 1, 2-hexanediol galactoside (HD-gal)을 합성하였다. 그리고, 합성된 HD-gal 분자를 확인하기 위하여, HD-gal에 대한 NMR (^1H - and ^{13}C -) 스펙트럼 분석과 mass 스펙트럼 분석을 실시하였다. HD-gal의 ^1H NMR 스펙트럼에서 HD에 갈락토실화가 되었음을 보여주는 다양한 피크를 확인하였다. ^1H NMR 스펙트럼의 다운필드인 δ_{H} 4.44 ppm과 δ_{H} 3.96~3.58 ppm에서 나타나는 다양한 피크들은 HD에 갈락토실화가 되었다는 것을 잘 암시하고 있으며, 또한 ^1H NMR 스펙트럼의 업필드에서 나타나는 δ_{H} 1.60~1.35 ppm과 0.92 ppm의 피크는 HD의 CH_2 와 CH_3 작용기로부터 나타나는 피크로써 HD가 본 물질에 존재한다는 것을 나타내고 있다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서는 HD-gal의 알파-아노머와 베타-아노머의 구조에서 기인하는 총 21의 카본피크가 나타났고, 각 아노머마다 12개의 카본이 존재하는데 이중 δ_{C} 68.6, 60.9 and 13.2 ppm에 보이는 3개의 카본은 겹쳐서 나타나 총 24개의 피크 중 21개가 나타났다. 또한, 질량스펙트럼 분석에서는 protonated HD-gal인 281.1601 (m/z)의 peak를 확인할 수 있었다. 이를 종합하면, NMR (^1H - and ^{13}C -) 스펙트럼 분석 결과와 질량분석 결과들은 우리가 기대했던 HD-gal의 구조와 매우 잘 일치하고 있다는 것을 알 수 있었다. 앞으로 추가적으로, 세균에 대한 minimum inhibitory concentrations (MICs) 조사와 human skin cell에 대한 독성연구를 추가적으로 진행할 예정이며, 이러한 결과를 근거로 항균력을 유지하면서 피부세포에 대한 독성이 감소된 화장품용 방부제의 연구/개발이 계속되기를 기대하고 있다.

주제어 : 1, 2-헥산디올 갈락토사이드, 베타-갈락토시데이즈, 핵자기공명분석, 질량분석, 화장품용 방부제

[†]Corresponding author
(E-mail: khjung@cjnu.ac.kr)

Abstract : 1, 2-Hexanediol galactoside (HD-gal) has been synthesized from 1, 2-hexanediol (HD), a cosmetic preservative, using recombinant *Escherichia coli* β -galactosidase (β -gal) at the high lactose concentration (300 g/l). To confirm the molecular structure of synthesized HD-gal, NMR (^1H - and ^{13}C -) spectroscopy and mass spectrometry of HD-gal were conducted. ^1H NMR spectrum of HD-gal showed multiple peaks corresponding to the galactocyl group, which is an evidence of galactacylation on HD. Downfield proton peaks at δ_{H} 4.44 ppm and multiple peaks from δ_{H} 3.96~3.58 ppm were indicative of galactacylation on HD. Up field proton peaks at δ_{H} 1.60~1.35 ppm and 0.92 ppm showed the presence of CH_2 and CH_3 protons of HD. ^{13}C NMR spectrum revealed the presence of 21 carbons suggestive of α - and β -anomers of HD-gal. Among 12 carbon peaks from each anomers, the 3 peaks at δ_{C} 68.6, 60.9 and 13.2 ppm were assigned to be overlapped showing only 21 peaks out of total 24 peaks. The mass value (protonated HD-gal, $m/z = 281.1601$) from mass spectrometry analysis of HD-gal, and ^1H and ^{13}C NMR spectral data were in well agreement with the expecting structure of HD-gal. For further study, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of HD-gal against bacteria will be investigated, and, in addition, cytotoxicity to human skin cells of HD-gal will be examined. It is expected that it will eventually be able to develop a new cosmetic preservative, which have low cytotoxicity against human skin cell and maintains antimicrobial effect.

Keywords : 1, 2-Hexanediol galactoside, β -Galactosidase, NMR spectroscopy, Mass spectrometry, Cosmetic preservative

1. 서론

1, 2-hexanediol (HD)는 화장품에 방부제(살균/보존제)로 주로 사용되고 있으며, 사용 농도는 1~2% 정도 이다. 이러한 1, 2-alkanediol 계열의 화합물에서 alkyl chain의 길이가 길어질수록 독성이 높아지며, 몇 가지 1, 2-alkanediol을 혼합하여 사용하면, 피부에 대한 독성이 있는 것으로 알려져 있다[1-3]. 본 연구팀에서는 보다 안전한 방부제 연구/개발을 위하여, HD 분자에 한 분자의 galactose를 효소를 이용하여 결합시킨, 1, 2-hexanediol galactoside (HD-gal)를 만드는 연구를 진행하여왔다[4]. HD 뿐만 아니라, chlorphenesin (CPN)과 phenoxyethanol (PE) 같은 화장품에 쓰이는 방부제에도 galactose를 한 분자 결합시켜서, chlorphenesin galactoside (CPN-gal)와 phenoxyethanol galactoside (PE-gal)를 같은 방법으로 이미 합성하였다[5, 6]. 합성된 CPN-gal과 PE-gal의 특성을 분석하여 보면, 원래 가지고 있던 CPN과 PE의 항균력에는 큰 변화가 없고, 피부세포에 대한 독성이 감소하는 긍정적인 결과를 얻었다[7, 8]. 이러한 결과는 transgalactosylation 반응에 의하여 만들

어진 CPN-gal과 PE-gal 분자의 피부세포 독성이 galactose 결합에 의하여 감소되었다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다. 이미 많은 연구에서 이러한 galactosylation이 의약품의 약물 특성을 변화시킬 수 있고, 보다 좋은 방향으로 의약품 분자의 특성을 개선 할 수 있다고 보고하고 있다[9-13].

본 연구의 transgalactosylation 반응에 사용한 효소는 재조합 대장균에서 발현된 β -galactosidase (β -gal)이며, 선행연구에서 보고한 것과 같이 대장균 세포 내에 inclusion body 형태로 발현되고, 활성 증진을 위하여 발현속도를 조절하였고, inducer (D-arabinose) 첨가 후, inducer analog를 첨가하여 발현시켰다[14]. Transgalactosylation 반응을 시킬 때에는 β -gal을 정제 하지 않고, 재조합 대장균 세포 자체를 직접 사용하였다. 그리고 lactose 농도를 300 g/l 정도 첨가하여, reverse hydrolysis 반응에 의하여 transgalactosylation 반응이 일어나도록 하였다.

본 연구에서는 HD-gal 합성에 대한 몇 가지 선행연구에 대한 후속 연구를 진행하였다. 첫 번째 선행연구에서는 β -gal 포함하는 재조합 대장균을 이용하여 transgalactosylation 반응으로

HD-gal이 합성된다는 사실을 실험적으로 확인하였고[4], 두 번째 연구로 합성된 HD-gal을 solvent extraction과 silica gel chromatography를 이용하여, 효과적으로 분리/정제하는 방법에 대하여 연구 중에 있다. 본 연구에서는 순수 분리된 HD-gal에 대한 ^1H - and ^{13}C -NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy, 그리고 mass spectrometry 연구를 수행하였다. 이를 통하여, HD-gal 분자에 한 분자의 galactose가 어떻게 결합하고 있는지에 대한 실험적 증거를 제시하려고 하였다. 앞으로 이러한 결과를 근거로 피부에 대한 독성이 감소된 화장품용 방부제 개발의 과학적 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 생각되며, HD-gal에 대한 항균시험과 세포 독성 실험 등을 추가로 실시할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 실험방법

2.1. 시약

1, 2-Hexanediol은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, HD-gal 정제를 위한 Silica gel은 Zeochem (Uetikon am See, Switzerland)의 ZEOprep 60 (60-200 μm)을 사용하였고, 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

2.2. β -Gal을 생산하는 재조합 대장균

대장균의 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 vector를 사용하여 *E. coli*를 발현 숙주로 하여 재조합 β -gal 효소를 발현하였다. 재조합 대장균제작과 재조합 β -gal을 함유한 *E. coli*의 배양방법 등에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기록하였다[14, 15].

2.3. β -Gal 함유 대장균을 이용한 HD-G 합성 및 정제

15 ml conical tube에 300 g/l lactose, 4.8 U/ml β -gal, 75 mM HD를 녹인 후, shaking incubator (37°C, 100 rpm)에서 48 시간 동안 반응시켜 HD-gal을 합성하였다. 기타 자세한 반응 조건과 반응물에서 순수한 HD-gal의 분리 정제 방법에 대하여서는 선행연구에 자세히 기술하였다[4].

2.4. ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy

400 MHz NMR Spectrometer (Bruker Ascend 400, Bruker, Germany)를 이용한 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR 분석을 하였다. 이 때, 사용한 solvent는 D_2O 이며, 정제된 HD-gal을 약 20 mg 1000 μl D_2O 에 녹여 NMR 시료로 사용하였다.

2.5. Mass spectrometry

SYNAPT G2 (Waters, UK) mass spectrometer를 사용하여 정제된 HD-gal의 질량 분석을 실시하였다. Ionization source는 ESI (electrospray ionization)으로, analyze type은 time of flight (TOF)로 하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy

^1H -NMR 스펙트럼은 HD에 galactosylation이 되었음을 보여주는 다양한 피크가 나타나 있다 (Fig. 1). ^1H -NMR 스펙트럼의 다운필드인 δ_{H} 4.44 ppm과 3.96~3.58 ppm에서 나타나는 다양한 피크들은 HD에 galactosylation이 되었다는 것을 잘 암시하고 있다(#1 peaks in Fig. 1). 또한 ^1H -NMR 스펙트럼의 업필드에서 나타나는 δ_{H} 1.60~1.35 ppm과 0.92 ppm의 피크는 HD의 CH_2 와 CH_3 작용기로부터 나타나는 피크로써 HD-gal이 본 물질에 존재함을 알 수 있다(#2 peaks in Fig. 1). ^1H NMR (400 MHz, D_2O) 4.44 (d, 1H, $J=7.7$ Hz), 3.96 (d, 1H, $J=3.0$ Hz), 3.92~3.90 (m, 1H), 3.86~3.76 (m, 2H), 3.79 (d, 1H, $J=4.4$ Hz), 3.74~3.70 (m, 2H), 3.68 (d, 1H, $J=2.9$ Hz), 3.58 (t, 1H, $J=8.8$ Hz), 1.60~1.45 (m, 2H), 1.40~1.35 (m, 4H), 0.92 (t, 3H, $J=6.7$ Hz).

^{13}C -NMR 스펙트럼은 HD-gal의 α -anomer와 β -anomer의 구조에서 기인하는 총 21 개의 탄소 피크가 나타났다. 각 anomer 마다 12 개의 탄소가 존재하는데 이중 δ_{C} 68.6, 60.9 그리고 13.2 ppm에 보이는 3개의 탄소는 겹쳐서 나타나 총 24 개의 피크 중 21개가 나타났다 (black dots in Fig. 2). 이로써, 본 물질에 HD-gal이 존재하고 있고, HD의 galactosylation이 되었다는 것을 확인 할 수 있다 (Fig. 2). ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) α -anomer: 103.4, 75.1, 74.2,

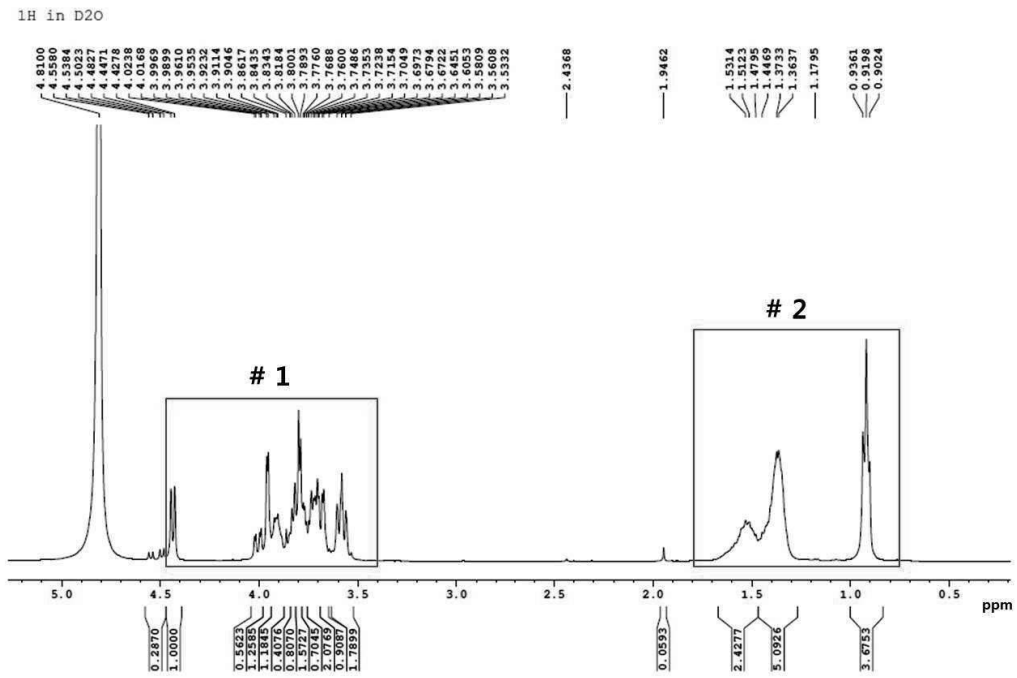


Fig. 1. ^1H -NMR spectrum of HD-gal.

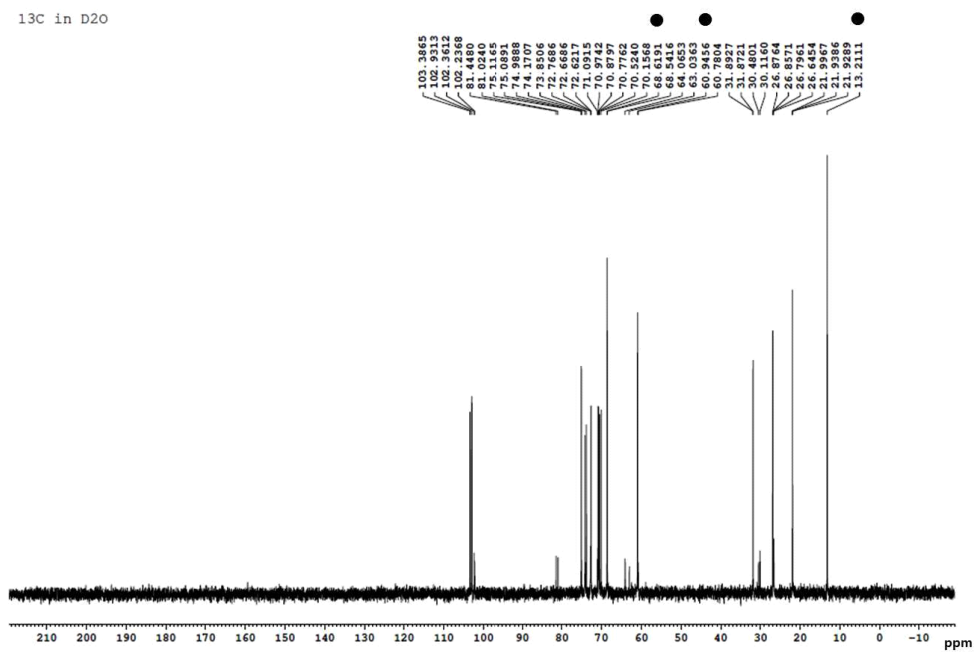


Fig. 2. ^{13}C -NMR spectrum of HD-gal.

72.7, 70.9, 70.5, 68.6, 60.9, 31.9, 26.9, 21.9, 13.2. β -anomer; 102.9, 75.1, 73.9, 72.6, 70.8, 70.2, 68.6, 60.9, 31.9, 26.9, 21.9, 13.2. 그러나, NMR 스펙트럼 결과에서는 HD 분자의 어떤 hydroxyl group (-OH)에 galactose가 결합했는지에 대한 증거를 찾을 수 없었다. 하지만 선행연구 결과에서는 β -gal에 의하여 CPN의 primary alcohol group에 galactose가 결합한다는 보고가 있다[16, 17]. 그래서, HD-gal도 primary alcohol group에 galactose가 결합했을 것으로 추론할 수 있다.

3.2. Mass spectrometry

Fig. 3과 같이 질량분석기 (ESI-MS)를 통해 정제된 HD-gal 분석의 질량을 분석한 결과 281.1601 (m/z)의 peak를 얻을 수 있었다. 이 질량 peak는 다음과 같이 추론 할 수 있었다

[118.174 (1, 2-hexanediol) + 180.156 (galactose) - 18.01528 (water) + 1.007276 (H⁺) = 281.3219762]. 그래서 이 peak를 HD-gal의 protonated form 이라고 확인하였고, 재조합 대장균 β -gal에 의해 HD-gal이 합성되었음을 확인하였다.

4. 결론

NMR (¹H- and ¹³C-) spectroscopy와 mass spectrometry 분석을 통하여, 재조합 대장균 β -gal을 이용하여 HD의 hydroxyl group에 galactose 한 분자를 결합시켜 합성한 HD-gal 분자구조와 질량을 확인하였다. 그리고, 이러한 transgalactosylation 반응을 Fig. 4와 같이 추론 할 수 있었다. 본 연구를 통하여, 이미 연구한

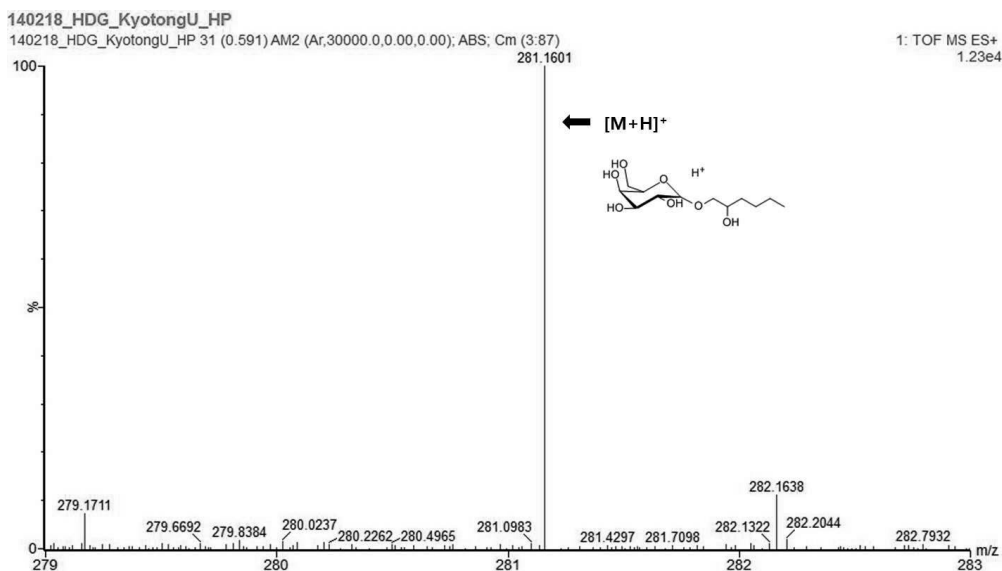


Fig. 3. Mass spectrum of HD-gal using ESI-MS. Arrow indicates a peak of protonate HD-gal ([M+H]⁺). In addition, molecular structure of HD-gal is shown below the arrow.

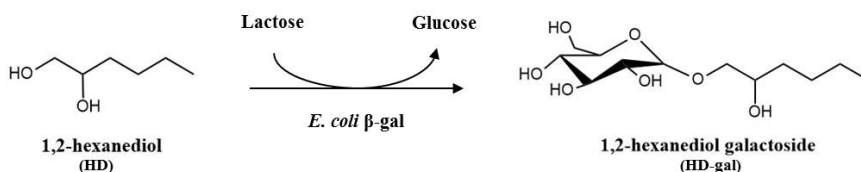


Fig. 4. Transgalactosylation reaction of HD using *E. coli* β -gal.

CPN-gal [7]과 PE-gal [8] 같이 항균력은 유지 하면서, 피부세포에 대한 독성이 감소된 화장품용 방부제 개발을 기대하고 있다.

감사의 글

본 연구는 2016년 한국교통대학교 지원을 받아 수행하였음.

References

1. W. Johnson Jr., W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. Liebler, J. G. Marks Jr., R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, and F. A. Andersen, Safety Assessment of 1, 2-Glycols as Used in Cosmetics. *Int. J. Toxicol.*, **31**(5 Suppl), 147S (2012).
2. E. Lee, S. An, S.-A. Cho, Y. Yun, J. Han, Y. K. Hwang, H. K. Kim, and T. R. Lee, The Influence of Alkane Chain Length on the Skin Irritation Potential of 1, 2-Alkanediols, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **33**(5), 421 (2011).
3. S. B. Levy, A. M. Dulichan, and M. Helman, Safety of a Preservative System containing 1, 2-Hexanediol and Caprylyl glycol, *Cutan. Ocul Toxicol.*, **28**(1), 23 (2009).
4. Y. -O. Kim and K. -H. Jung, Enzymatic Synthesis of 1, 2-Hexanediol Galactoside by Whole cells of β -Galactosidase-containing Recombinant *Escherichia coli*. *J. Life Sci.*, **26**(5), 608 (2016).
5. S. -E. Lee, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung, Production of Chlorphenesin Galactoside by Whole Cells of β -Galactosidase-containing *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**(6), 826 (2013).
6. H. -Y. Lee and K. -H. Jung, Enzymatic Synthesis of 2-Phenoxyethanol Galactoside by Whole Cells of β -Galactosidase-containing *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(9), 1254 (2014).
7. S. -E. Lee, T. M. Jo, H. -Y. Lee, J. Lee, and K. -H. Jung, β -Galactosidase-catalyzed Synthesis of Galactosyl Chlorphenesin and its Characterization, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **171**(6), 1299 (2013).
8. K. -H. Jung and H. -Y. Lee, *Escherichia coli* β -Galactosidase-catalyzed Synthesis of 2-Phenoxyethanol Galactoside and its Characterization, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38**(2), 365 (2015).
9. G. D. Benjamin and M. A. Robinson, Drug Delivery Systems based on Sugar-macromolecule Conjugates, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **5**(2), 279 (2002).
10. J. Huang, F. Gao, X. Tang, J. Yu, D. Wang, S. Liu, and Y. Li, Liver-targeting Doxorubicin-conjugated Polymeric Prodrug with pH-Triggered Drug Release Profile, *Polym. Int.*, **59**(10), 1390 (2010).
11. D. Melisi, A. Curcio, E. Luongo, E. Morelli, and M. G. Rimoli, D-Galactose as a Vector for Prodrug Design, *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**(18), 2288 (2011).
12. L. F. Tietze and K. Schmuck, Prodrugs for Targeted Tumor Therapies: Recent Developments in ADEPT, GDEPT and PMT, *Curr. Pharm. Design*, **17**(32), 3527 (2011).
13. L. Q. Yan, N. Li, and M. H. Zong, First Enzymatic Galactosylation of Acyclic Nucleoside Drugs by β -Galactosidase: Synthesis of Water-soluble β -D-Galactosidic Prodrugs, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **19**(4), 586 (2014).
14. K. -H. Jung, Enhanced Enzyme Activities of Inclusion Bodies of Recombinant β -Galactosidase via the Addition of Inducer Analog after L-Arabinose Induction in the *araBAD* Promoter System of *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**(3), 434 (2008).
15. K. -H. Jung, J. -H. Yeon, S. -K. Moon, and J. -H. Choi, Methyl α -D-Glucopyranoside Enhances the Enzymatic

- Activity of Recombinant β -Galactosidase Inclusion Bodies in the *araBAD* Promoter System of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**(7), 695 (2008).
16. N. Bridiau, S. Taboubi, N. Marzouki, M. D. Legoy, and T. Maugard, β -Galactosidase Catalyzed Selective Galactosylation of Aromatic Compounds, *Biotechnol. Prog.*, **22**(1), 326 (2006).
17. C. Scheckermann, F. Wagner, and L. Fischer, Galactosylation of Antibiotics using the β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Enzyme Microb. Technol.*, **20**(8), 629 (1997).