

대장균 β -galactosidase를 이용한 benzyl alcohol galactoside의 합성 연구

정경환[†]

한국교통대학교 생명공학과

(2019년 5월 21일 접수: 2019년 6월 28일 수정: 2019년 6월 28일 채택)

Enzymatic synthesis of benzyl alcohol galactoside using *Escherichia coli* β -galactosidase

Kyung-Hwan Jung[†]

Major in Biotechnology, Korea National University of Transportation
Jeungpyung, Chungbuk 27909, Republic of Korea

(Received May 21, 2019; Revised June 28, 2019; Accepted June 28, 2019)

요 약 : 최근에 화장품, 식품, 그리고 의약품의 첨가제로 사용되어지는 benzyl alcohol (BzOH)에 대한 독성 문제와 피부 알러지 문제가 보고되고 있다. 그래서, 본 연구에서는 이러한 첨가제의 문제점을 해결하기 위하여 galactose 한 분자를 BzOH 분자에 결합시킨 benzyl alcohol galactoside (BzO-gal)를 합성하여 이러한 문제를 해결하려는 시도를 수행하였다. 이미 선행연구에서 대장균의 β -galactosidase (β -gal)를 이용하여 BzOH로부터 BzO-gal이 transgalactosylation 반응으로 합성된다는 것을 확인하였다. 본 연구에서는 먼저 대장균의 β -gal을 이용하여 BzOH로부터 BzO-gal의 합성을 반응액의 액체 크로마토그래피/질량 분석을 이용하여 BzO-gal-sodium adduct ion ($m/z=293.1004$)과 BzO-gal의 protonated ion ($m/z=271.1180$)의 검출로 확인할 수 있었다. 그리고, BzOH로부터 BzO-gal로의 합성 반응을 실시 할 때, 최적의 β -gal 양, BzOH 양, 반응 온도, 반응 pH, lactose 농도 등 반응의 최적 조건을 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과 0.75 U/ml β -gal, 185 mM BzOH, 온도 40°C, pH 7.5, 350 g/l lactose의 조건이 가장 많은 양의 BzO-gal이 합성되는 최적의 조건을 확인하였다. 또한, BzO-gal의 최적 합성 조건에서 36시간 동안 β -gal에 의하여 185 mM BzOH로부터 약 131 mM BzO-gal이 합성되었고, 이 때, 전환 수율(conversion, %)은 약 72%로 확인되었다. 본 연구를 통하여 보다 안전한 식품, 화장품, 그리고 의약품용 첨가제의 개발을 기대하고 있으며, BzO-gal의 특성 분석 등 추가적인 연구를 계획하고 있다.

주제어 : 벤질알코올 갈락토사이드, 베타-갈락토시데이즈, 트랜스갈락토실레이션, 대장균, 방부제

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

Abstract : Recently, it has been reported that benzyl alcohol (BzOH) as an additive in cosmetics, food, and medicine lead to toxicity and allergy problem. Then, to circumvent this hurdle, we carried out the synthesis of benzyl alcohol galactoside (BzO-gal). Previously, it was confirmed that BzO-gal was synthesized by transgalactosylation reaction using *Escherichia coli* (*E. coli*) β -galactosidase (β -gal). Meanwhile, in this study, two peaks of BzO-gal as sodium adduct ion ($m/z=293.1004$) and protonated ion ($m/z=271.1180$) were detected in the reaction mixture by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS). In addition, the amount of β -gal and BzOH concentration, temperature, pH, and lactose concentration, respectively, were optimized (β -gal, 0.75 U/mL; BzOH, 185 mM; temperature, 40°C, pH, 7.5; lactose, 350 g/l). Under these optimal conditions, 185 mM BzOH was converted into about 131 mM BzO-gal, in which the conversion yield was about 72%. In the future, BzO-gal will be applicable as a substitute for BzOH as a less toxic preservative for the cosmetic, pharmaceutical, and food industries, and we are planning to investigate the characteristics of BzO-gal as a preservative.

Keywords : benzyl alcohol galactoside, β -galactosidase, transgalactosylation, *Escherichia coli*, preservative

1. 서론

Benzyl alcohol (BzOH)은 현재 식품 산업, 화장품 산업, 그리고 제약 산업에서 착향제와 방부제로서 많이 사용되고 있다. 그렇지만, BzOH 사용 중 발생하는 독성 문제와 피부 알러지 문제도 몇몇 보고를 통하여 알려지고 있다[1-4]. 본 연구 팀에서는 그 동안 이와 같은 첨가제의 문제점을 해결하기 위한 방법으로 galactose 한 분자를 첨가제 분자에 결합시켜서, 독성과 알러지 문제를 해결하려는 시도를 진행하여 왔다[5,6]. Galactose 한 분자를 어떤 분자에 결합시키는 방법으로는 β -galactosidase (β -gal)을 이용한 역가수분해 (reverse hydrolysis) 혹은 transgalactosylation 방법을 이용하였다. 이 반응은 lactose 농도가 매우 높은 조건에서 수행되며, 어떤 분자에 효소 β -gal이 lactose로부터 galactose 한 분자를 잘라서 결합시키는 반응이다.

그 동안 본 연구팀에서는 chlorphenesin (CPN), 2-phenoxyethanol (PE), 1, 2-hexanediol (HD) 분자에 이러한 반응을 이용하여, galactose 한 분자가 결합된 galactoside 유도체를 합성하였다[7-14]. 그리고, 최근 BzOH의 galactoside 유도체인 benzyl alcohol galactoside (BzO-gal)의 합성을 수행하여 이를 확인 하였다

[15]. 이 때, CPN, PE 그리고 HD와 합성된 chlorphenesin galactoside (CPN-gal), 2-phenoxyethanol galactoside (PE-gal), 1, 2-hexanediol galactoside (HD-gal)와의 항균력 및 인간 피부세포에 대한 독성 비교연구도 함께 수행하였는데, 인간 피부세포에 대한 세포독성 연구에서는 CPN-gal, PE-gal, 그리고 HD-gal이 CPN, PE, 그리고 HD 보다 더 적음을 확인할 수 있었다[7,9,13]. 다시 말하면, CPN, PE, 그리고 HD의 galactoside 유도체가 인간 피부세포에 독성이 적고, 안전할 수 있다는 실험 결과를 얻을 수 있었다. 이 때, HD의 galactose 유도체인 HD-gal에서는 항균력에서 약간의 손실이 관찰되었지만[14], CPN-gal과 PE-gal의 경우에는 CPN과 PE와 같은 항균력을 보여 주었다[7,9].

지금까지 효소 β -gal을 이용한 BzOH의 galactoside 유도체를 합성한 연구 문헌도 몇 개 보고되고 있다[16,17]. 최근 본 연구팀에서는 재조합 대장균의 β -gal을 이용하여 BzO-gal 합성을 시도하였으며, BzO-gal 합성이 대장균 β -gal을 이용하여 가능함을 확인하였다[15]. 그래서, 본 연구에서는 BzOH의 galactoside 유도체의 합성을 액체 크로마토그래피(LC)/질량 분석기(ESI-MS, liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry)로 다시 한번 확인하고, BzO-gal의 합성 반응 최적조건을 찾는 연

구를 수행하고, 또한, 최적 조건에서 BzOH에서 BzO-gal로의 전환 수율(합성 수율)을 관찰하는 연구를 수행하였다. 본 연구를 통하여 보다 안전한 식품, 화장품, 그리고 의약품용 첨가제의 개발을 기대하고 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 β -gal 생산 대장균

Benzyl alcohol은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, TLC (thin-layer chromatography) plate는 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Germany)의 precoated plates SIL HD UV₂₅₄ (MN809222)를 사용하였다. BzO-gal 정제를 위한 Silica gel은 Zeochem (Uetikon am See, Switzerland)의 ZEOprep 60 (60-200 μ m)을 사용하였고, 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다. 대장균의 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 pBAD/*Myc-His/lacZ* vector (7.2 kb) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 *E. coil* MC 1061를 발현 숙주로 하여 β -gal을 발현하였다. 재조합 *E. coil* 제작과 재조합 β -gal을 함유한 *E. coil*의 배양방법 등에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기록하였다[18].

2.2. BzO-gal 합성

BzO-gal 합성을 위하여 50 ml conical tube에 92.5 mM BzOH, 0.45 U/ml β -gal, 300 g/l lactose를 넣고 (50 mM phosphate buffer, pH 8.0), 전체 부피를 40 ml로 맞추고, shaking incubator에서 40°C, 100 rpm 조건으로 12 시간 동안 반응 시켰다 (Fig. 1). 최적 합성조건 연구

를 위하여서는 50 ml conical tube에서 β -gal 농도, BzOH 농도, 온도, pH, lactose 농도 순서로 최적 합성조건을 찾는 실험을 수행하였다. 전체 반응 부피는 40 ml로 맞추었고, 50 mM phosphate buffer를 사용하였다.

2.3. 액체 크로마토그래피/질량 분석기 분석

액체 크로마토그래피(LC)/질량 분석기(ESI-MS) (SYNAPT G2, Waters, UK)를 사용하여 반응액에서 BzO-gal의 질량을 분석하였다. LC에서는 C₁₈ column을 사용하였고, 용매 A (0.1% formic acid in water)와 용매 B (0.1% formic acid in acetonitrile)를 gradient로 column에 공급하였다. ESI-MS에서는 time of flight (TOF)로 분석하였고, polarity는 positive 조건에서 분석하였다.

2.4. TLC 분석

20 × 10 cm TLC plate에 1.0 μ l 시료를 loading하고 이동상(acetonitrile : water = 85 : 15 (v/v)) 으로 15 분 전개하였다. 그리고 staining solution (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 ml 10% NaOH in 200 ml water)를 TLC plate에 뿌린 후, 80°C oven에서 15 분간 말려서 밴드를 확인 하였다. BzOH의 정량 분석을 위하여 TLC plate상의 이미지를 스캔한 후, AlphaEase FC software (Alpha Innotech, San Leonardo, CA, USA)를 이용하여 band의 크기를 정량 분석하였으며, 이 때, 표준농도의 BzOH 시료를 같이 분석하였다. BzO-gal의 합성량은 BzOH로부터 BzO-gal로 모두 conversion 되었다고 가정하고 BzOH 감소량으로부터 계산하였다. 그래서, BzOH로부터 BzO-gal로의 전환 수율 (conversion, %)은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

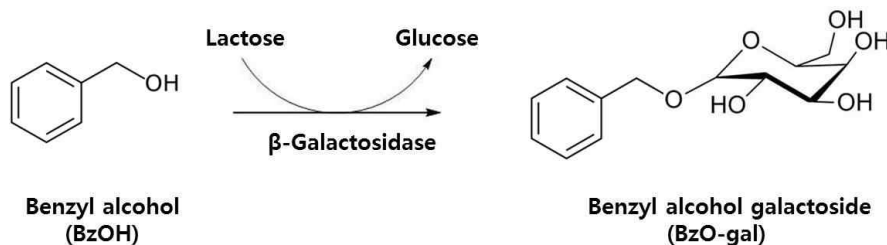


Fig. 1. Enzymatic synthesis of BzOH-gal using β -gal.

Conversion (%) = $(\text{BzOH}_0 - \text{BzOH}_t) / \text{BzOH}_0$
 (BzOH_0 = 반응 초기의 HD 양, BzOH_t = t 시간에 BzOH 양)

3. 결과 및 고찰

3.1. 반응액에서 질량 분석

BzO-gal을 대장균 β -gal을 이용하여 trnasgalactosylation 반응으로 합성한 후, Fig. 2

와 같이 BzO-gal의 합성을 TLC로 확인하였다. 그리고, 반응액을 액체 크로마토그래피-질량 분석기(LC/ESI-MS)를 이용하여 분석하였다(Fig. 3). 그 결과 BzO-gal의 sodium adduct ion과 protonated ion으로 추론할 수 있는 293.1004 (m/z)와 271.1180 (m/z) 두 개의 peak를 관찰할 수 있었다(Table 1). 이러한 peak 확인을 통하여 β -gal에 의해 BzOH로부터 BzO-gal이 합성되었음을 확인할 수 있었다.

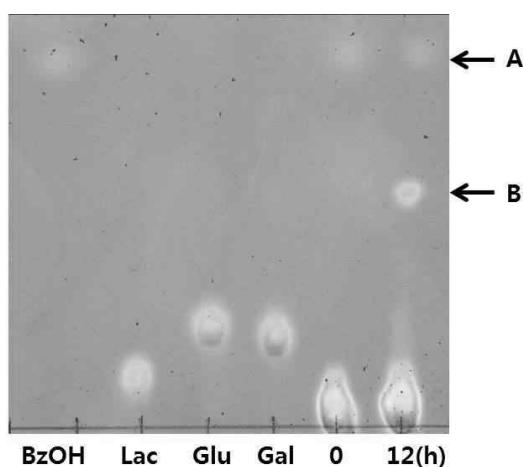


Fig. 2. TLC analysis for BzOH-gal synthesis using β -gal, in which zero- and 12-h samples were analyzed. BzOH, Lac, Glu, and Gal represent 1% standards of benzyl alcohol, lactose, glucose, and galactose, respectively. Arrow A and B indicate BzOH and BzOH-gal, respectively.

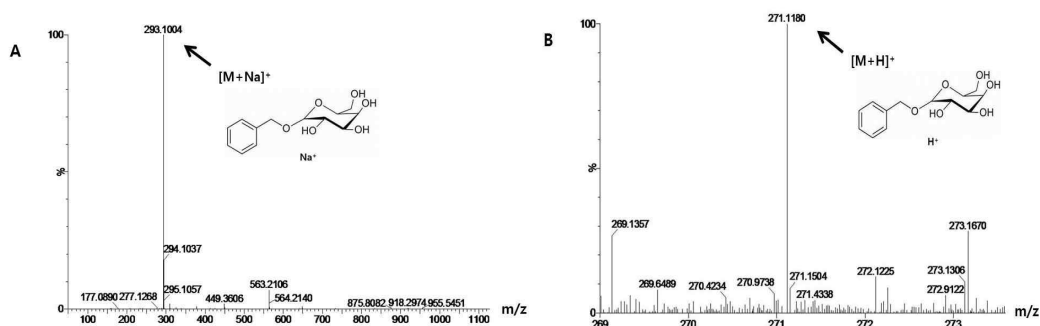


Fig. 3. High resolution ESI mass spectrum data of purified BzOH-gal. The mass spectrum was obtained in positive-ion mode. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and $[\text{M}+\text{H}]^+$ indicate sodium adduct ion and protonated form of BzOH-gal, respectively. The preferred structure of BzOH-gal are shown in the mass spectrum.

3.2. BzO-gal 합성을 위한 최적조건

BzO-gal의 최적합성 조건을 조사하기 위하여 β -gal 농도, BzOH 농도, 온도, pH, lactose 농도 변화에 따른 BzO-gal 합성량을 TLC로 관찰하였다(Fig. 4). 그리고, 상대적인 BzO-gal 합성량으로부터 최적의 BzO-gal 합성 조건을 확인하였다. 그 결과는 0.75 U/ml β -gal, 185 mM BzOH, 온도 40°C, pH 7.5, 350 g/l lactose 조건에서 최적의 조건에서 BzO-gal이 합성되는 것을 확인 하였다(Fig. 5).

3.3. 최적 조건에서의 BzO-gal 합성

Fig. 4와 Fig. 5 실험을 통하여 얻은 BzO-gal의 최적 합성 조건을 이용하여 185 mM BzOH로부터 BzO-gal을 합성하는 반응을 48시간 동안 실시하여, Fig. 6과 같이 TLC로 분석하여 보았

다. 그리고, 정량적인 분석을 통하여 Fig. 7과 같이 48 시간 동안의 BzOH와 BzO-gal의 변화와 BzOH로부터 BzO-gal로의 전환 수율(conversion, %)을 계산하여 보았다. 그 결과 36 시간 만에 β -gal에 의하여 185 mM BzOH로부터 약 131 mM BzO-gal이 합성되었다. 이 때, BzOH로부터 BzO-gal로의 전환 수율(conversion, %)은 약 72%로 계산되었다. 한편, 본 연구팀의 선행연구에 의하면, CPN, PE, 그리고 HD로부터 CPN-gal, PE-gal, 그리고 HD-gal의 전환 수율은 각각 약 64-67% [7,8], 약 37.5-50% [9,10]. 그리고 약 96% [14]로 보고되고 있다. 본 연구에서의 BzOH에서 BzO-gal로의 약 72%의 전환 수율은 CPN과 PE에 비하면 높은 편이고, HD에 비하면 낮은 값이라고 할 수 있다.

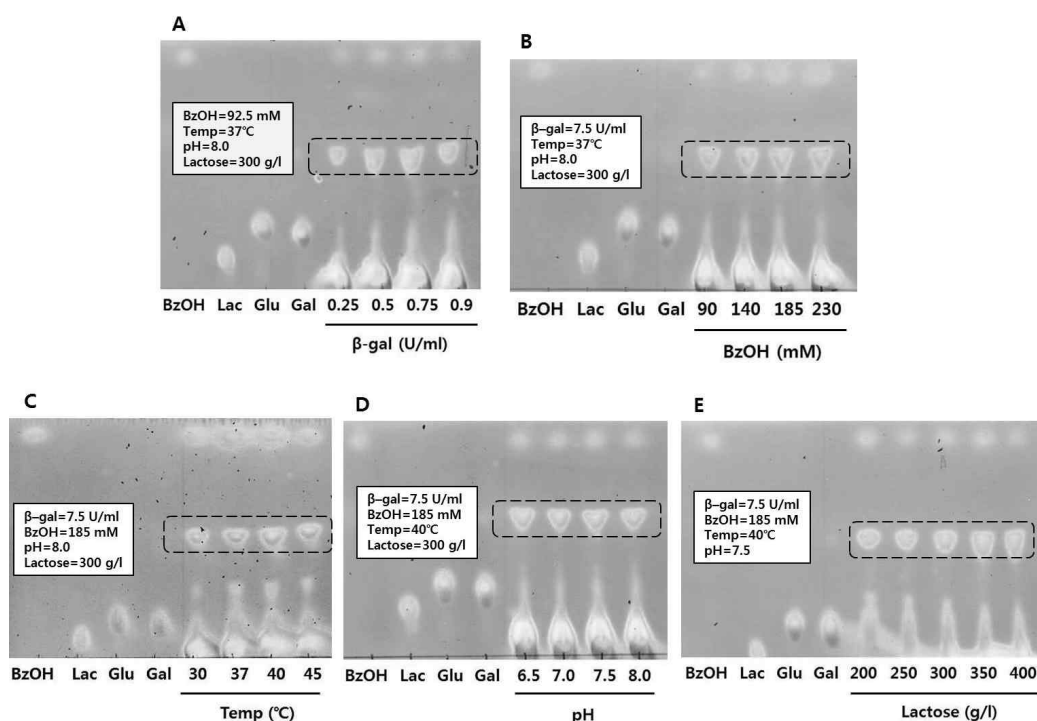


Fig. 4. Effects of (A) the amount of β -gal, (B) BzOH concentration, (C) temperature, (D) pH, and (E) lactose concentration on BzOH-gal synthesis. The samples collected at 18 h were used for TLC analysis. The reaction conditions are shown within the box in each chromatogram. Dashed boxes indicate the synthesized BzOH-gal. BzOH, Lac, Glu, and Gal represent 1% standards of benzyl alcohol, lactose, glucose, and galactose, respectively.

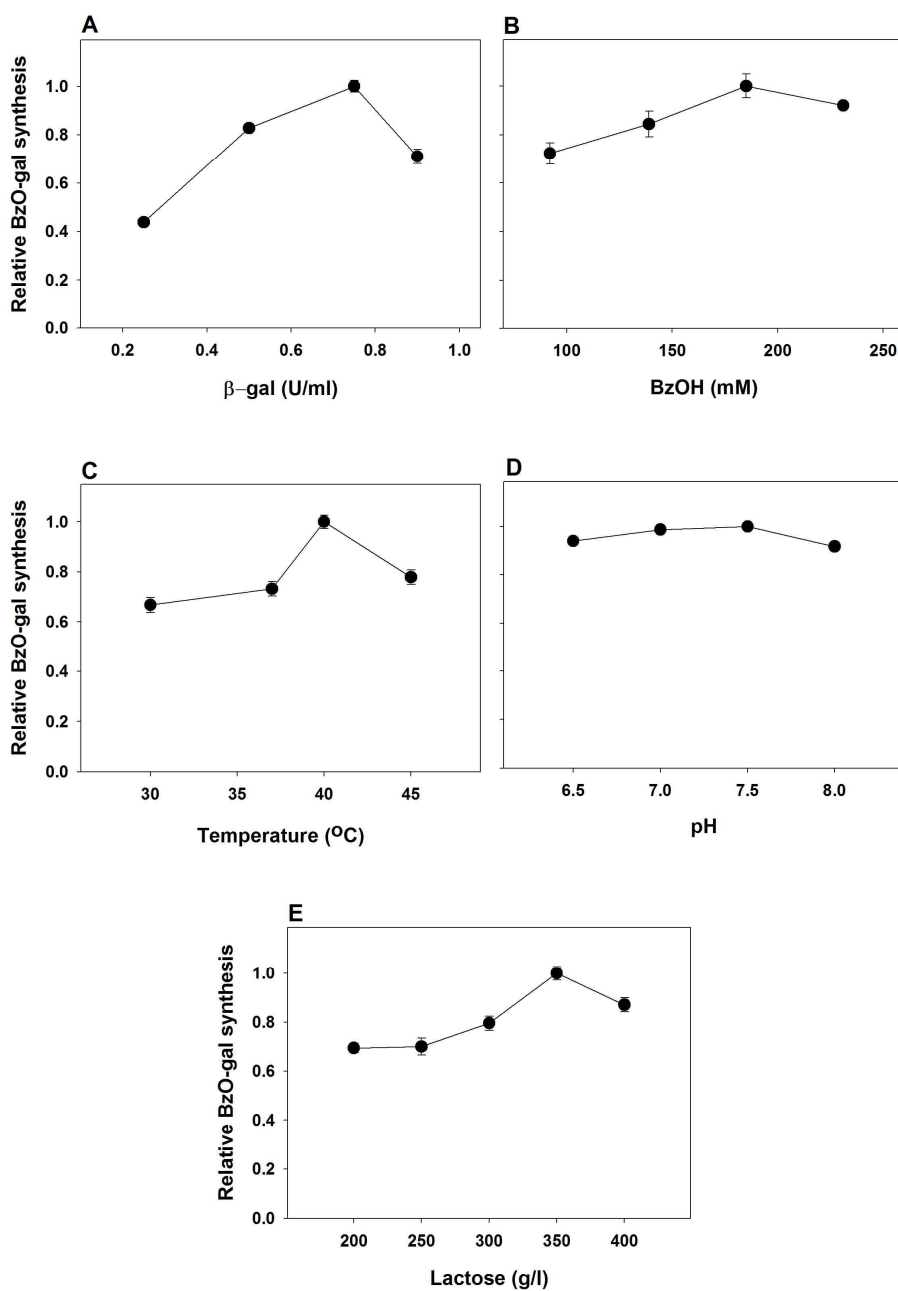


Fig. 5. Optimal conditions for BzOH-gal synthesis by β -gal. Values of relative BzOH-gal synthesis were calculated on the basis that the maximum synthesis of BzOH-gal was 1.0 under each condition, in which BzOH-gal syntheses were measured as scanned TLC spot areas. (A) Optimization of the amount of β -gal. (B) Optimization of BzOH concentration. (C) Temperature optimization. (D) pH optimization. (E) Optimization of lactose concentration. All measurements were conducted three times ($n=3$) using the same sample, and the average and standard deviation were calculated.

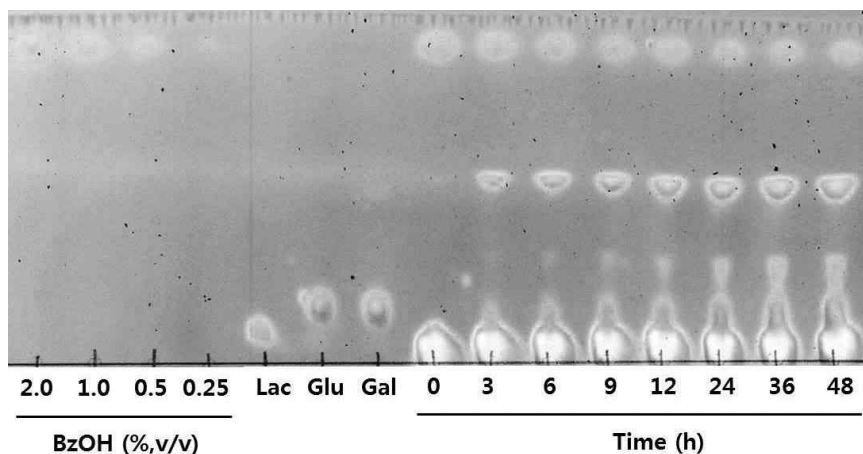


Fig. 6. TLC analysis of BzO-gal synthesis under optimal conditions. BzOH standard (0.25–2.0%, v/v) was used. Lac, Glu, Gal indicate 1% standards of lactose, glucose, and galactose, respectively.

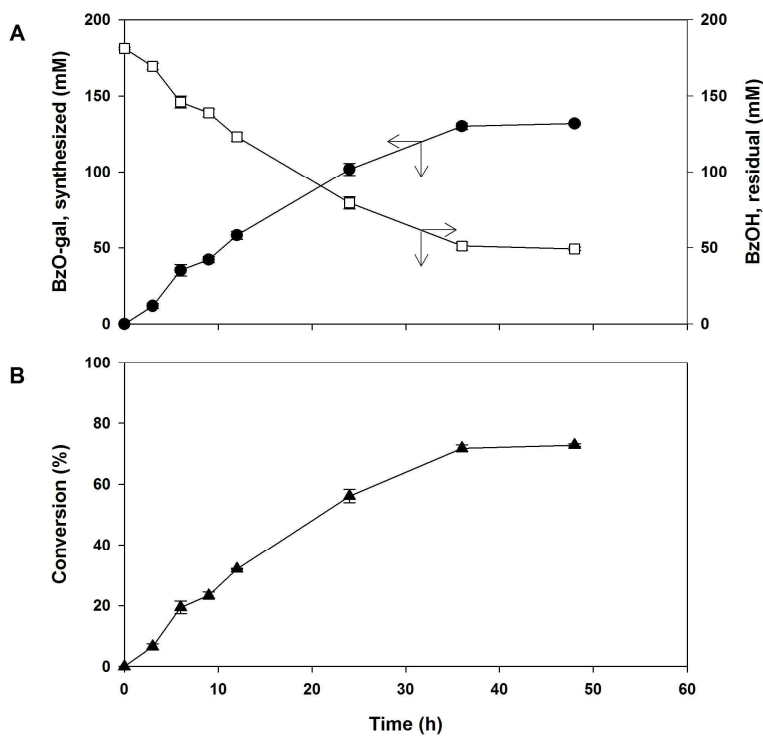


Fig. 7. (A) Time-course profiles of BzOH and BzO-gal under optimal conditions for BzO-gal synthesis using β -gal. BzOH and BzO-gal were analyzed by TLC-image analysis of Fig. 6. (B) Percent conversion of BzOH to BzO-gal. All measurements were performed three times (n=3) using the same sample, and the average and standard deviation were calculated.

4. 결론

대장균 β -gal을 이용하여 trnasgalactosylation 반응으로 합성된 BzO-gal을 액체 크로마토그래피/질량 분석기(LC/ESI-MS)를 이용하여 확인하였다. 이 때, 293.1004 (m/z)의 BzO-gal의 sodium adduct ion과 271.1180 (m/z)의 BzO-gal의 protonated ion이 관찰되었다. 그리고, 최적의 BzO-gal의 최적합성 조건은 0.75 U/ml β -gal, 185 mM BzOH, 온도 40°C, pH 7.5, 350 g/l lactose 조건인 것으로 확인 되었으며, 185 mM BzOH로부터 48시간 동안 약 131 mM BzO-gal이 합성되는 것으로 관찰되었다. 이 때, BzOH로부터 BzO-gal로의 전환 수율 (conversion, %)은 약 72%로 계산되었다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2018년도 맞춤형 기술파트너 지원사업(No. C0652452)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다. 그리고, 한국교통대학교 생명공학과 이혜원, 박광숙, 고힌은 학생, (주)제이엔제이푸드 관계자분 들이 본 연구에 도움을 주셨습니다.

References

1. S. Sestini, M. Mori, S. Francalanci, "Allergic contact dermatitis from benzyl alcohol in multiple medicaments", *Contact Dermatitis*, Vol.50, No.5, pp. 316-317, (2004).
2. M. Corazza, L. Mantovani, C. Maranini, A. Virgli, "Allergic contact dermatitis from benzyl alcohol", *Contact Dermatitis*, Vol.34, No.1, pp. 74-75, (1996).
3. E. J. Curry, E. M. Warshaw, "Benzyl alcohol allergy: Importance of patch testing with personal products", *Dermatitis*, Vol.16, No.4, pp. 203-208, (2005).
4. E. Shmunes, "Allergic dermatitis to benzyl alcohol in an injectable solution", *Arch. Dermatol.*, Vol.120, No.9, pp. 1200-1201, (1984).
5. D. Melisi, A. Curcio, E. Luongo, E. Morelli, M. G. Rimoli, "D-Galactose as a vector for prodrug design", *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol.11, No.18, pp. 2288-2298, (2011).
6. H. Devalapally, K. S. Rajan, R. R. Akkinepally, R. K. Devarakonda, "Safety, pharmacokinetics and biodistribution studies of a β -galactoside prodrug of doxorubicin for improvement of tumor selective chemotherapy", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, Vol.34, No.8, pp. 789-795, (2008).
7. S. E. Lee, T. M. Jo, H. Y. Lee, J. Lee, K.-H. Jung, " β -Galactosidase-catalyzed synthesis of galactosyl chlorphenesin and its characterization", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol.171, No.6, pp. 1299-1312, (2013).
8. S. E. Lee, H. Y. Lee, K.-H. Jung, "Production of chlorphenesin galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol.23, No.6, pp. 826-832, (2013).
9. K.-H. Jung, H. Y. Lee, "*Escherichia coli* β -galactosidase-catalyzed synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside and its characterization", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, Vol.38, No.2, pp. 365-372, (2015).
10. H. Y. Lee, K.-H. Jung, "Enzymatic synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.24, No.9, pp. 1254-1259, (2014).
11. Y.-O. Kim, K.-H. Jung, "Enzymatic synthesis of 1, 2-hexandiol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing recombinant *Escherichia coli*", *J. Life Sci.*, Vol.26, No.5, pp. 608-613, (2016).
12. Y.-O. Kim, H. Y. Lee, K.-H. Jung, "NMR spectroscopy and mass spectrometry of 1, 2-hexandiol galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -galactosidase", *J. Korean Oil*

- Chemists' Soc.*, Vol.33, No.2, pp. 286-292, (2016).
13. J.-S. Kim, K.-H. Jung, "Cytotoxic effects of 1, 2-hexanediol and 1, 2-hexanediol galactoside on HaCaT cell", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.44, No.3, pp. 343-347, (2018).
 14. Y.-O. Kim, K.-H. Jung, "Water-holding capacity and antimicrobial activity of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized by β -galactosidase", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.43, No.4, pp. 373-379, (2017).
 15. H.-Y. Lee, K.-H. Jung, "NMR spectroscopy and mass spectrometry of benzyl alcohol galactoside synthesized using β -galactosidase", *J. Kor. Appl. Sci. Technol.*, Vol.36, No.1, pp. 84-89, (2019).
 16. D. E. Stevenson, R. A. Stanley, R. H. Furneaux, "Optimization of alkyl β -D-galactopyranoside synthesis from lactose using commercially available β -galactosidases", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.42, No.5, pp. 657-666, (1993).
 17. M. Rauter, M. Schwarz, K. Becker, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, H.-M. Vorbrod, "Synthesis of benzyl β -D-galactopyranoside by transgalactosylation using a β -galactosidase produced by the over expression of the *Kluyveromyces lactis* LAC4 gene in *Arxula adeninivorans*", *J. Mol. Catal. B Enzym.*, Vol.97, pp. 319-327, (2013).
 18. 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.*, Vol.18, No.3, pp. 434-442, (2008).