

대장균 베타-갈락토시테이즈를 이용하여 합성된 Phenylethanol Galactoside의 NMR Spectroscopy 및 Mass spectrometry

이향렬 · 정경환[†]

한국교통대학교 생명공학전공, 교수
(2020년 9월 7일 접수: 2020년 10월 29일 수정: 2020년 10월 29일 채택)

NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry of Phenylethanol Galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -Galactosidase

Hyang-Yeol Lee · Kyung-Hwan Jung[†]

Major in Biotechnology, Korea National University of Transportation,
Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Republic of Korea
(Received September 7, 2020; Revised October 29, 2020; Accepted October 29, 2020)

요 약 : 대장균 효소 β -gal를 이용하여 합성된 phenylethanol galactoside (PhE-gal)의 분자구조를 NMR (^1H -와 ^{13}C -)과 고성능 mass spectrometry를 이용하여 분석하였다. 그 결과 PhE-gal은 ^1H NMR에서 2-phenylethanol (PhE)에 갈락토실기가 도입되었음을 나타내는 피크가 나타났다. 방향족 고리에서 오는 δ_{H} 7.30~7.21 ppm의 피크와 δ_{H} 2.88 ppm에 나타난 벤질기 위치의 CH_2 에서 오는 피크는 PhE가 존재함을 나타낸다. 지방족 사슬 영역인 δ_{H} 4.31 ppm, 4.07 ppm과 δ_{H} 3.86~3.38 ppm에서 나타나는 7개의 proton 피크로부터 단당류가 도입되었음을 확인할 수 있었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 나타난 12개의 탄소 피크 중 4개의 피크는 방향족 고리인 페닐기로부터, 또한 단당류에서 기인한 6개의 탄소피크가 존재하므로 PhE에 단당이 도입되었음을 알 수 있다. PhE-gal의 분자량을 확인하기 위하여 질량분석기로 분석한 결과 m/z 가 307.1181인 PhE-gal의 sodium adduct ion ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)이 나타나 생성물이 PhE-gal임을 알 수 있었다. 따라서 본 연구결과 *E. coli* β -galactosidase에 의한 촉매반응으로 PhE에 갈락토스가 첨가된 생성물인 PhE-gal이 성공적으로 생합성 되었음을 확인하였다.

주제어 : 페닐알코올 갈락토사이드, 베타-갈락토시테이즈, 갈락토오스 전달반응, 핵자기공명분석, 질량분석

Abstract : To characterize the molecular structure of PhE-gal synthesized using *Escherichia coli* β -gal, NMR (^1H - and ^{13}C -) spectroscopy and mass spectrometry of PhE-gal were conducted. ^1H NMR spectrum of PhE-gal showed multiple peaks corresponding to the galactosyl group, which is an evidence of galactosylation on 2-phenylethanol (PhE). Downfield proton peaks at δ_{H} 7.30~7.21

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

ppm showed the presence of aromatic protons of PhE as well as benzyl CH₂ protons at δ_H 2.88 ppm. Up field proton peaks at δ_H 4.31 ppm, 4.07 ppm and multiple peaks from δ_H 3.86~3.38 ppm are indicative of galactoylation on PhE. ¹³C NMR spectrum revealed the presence of 12 carbons suggestive of PhE-gal. Among 12 carbon peaks from PhE-gal, the four peaks at 138.7, 129.0, 128.6 and 126.5 were assigned aromatic carbons in the phenyl ring. Three peaks at 129.0, 128.6 and 126.5 showed high intensities, indicating CH aromatic carbons. ¹³C NMR data of PhE-gal showed 6 monosaccharide peaks from galactose and 2 peaks from aliphatic chain of PhE, indicating that PhE-gal was galactosyl PhE. The mass value (sodium adduct ion of PhE-gal, m/z = 307.1181) from mass spectrometry analysis of PhE-gal, and ¹H and ¹³C NMR spectral data were in good agreement with the expecting structure of PhE-gal. We are expecting that through future study it will eventually be able to develop a new additive with low cytotoxicity.

Keywords : Phenylethanol galactoside, β -Galactosidase, Transgalactosylation, NMR spectroscopy, Mass spectrometry

1. 서론

화장품과 식품에 첨가물로 사용되는 2-phenylethanol (PhE, CAS number: 98-85-1, Chemical formula: C₈H₁₀O) (Fig. 1)는 비교적 안전한 물질로 알려져 있으며 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Phenylethanol>), 여러 안전성에 관련된 평가 보고에서도 유해한 수준의 독성을 가지고 있다는 증거는 찾을 수 없다[1,2].

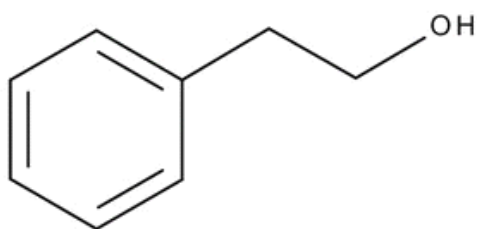


Fig. 1. 2-Phenylethanol.

PhE는 장미 향기가 나고, 항균 활성이 있는 물질로 화장품에는 방향 성분과 보존제로 사용되고, 식품산업에도 이러한 목적으로 첨가물로 사용되고 있다. 그러나, PhE의 안전성 문제는 화장품의 방향 성분에 대하여 꾸준히 제기되고 있는 부작용 문제와 함께 관심의 대상으로 떠오르고 있다 [3,4,5]. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 본 연구에서는 PhE에 galactose 한 분자를 결합시켜

PhE의 galactoside 유도체(phenylethanol galactoside, PhE-gal)를 합성하는 연구를 수행하였다.

본 연구팀에서는 이미 항균 활성을 가지고 있어서 화장품 보존제로 사용되고 있는 chlorphenesin (CPN)[6,7], phenoxyethanol (PE)[8,9], 1,2-hexanediol (HD)의 galactoside 유도체 합성 [10,11]을 대장균 효소(*Escherichia coli* β -galactosidase)를 사용하여 transgalactosylation 방법으로 합성하는 연구를 수행하였다. 이 선행연구 결과에서 chlorphenesin galactoside (CPN-gal)[7], phenoxyethanol galactoside (PE-gal)[8], 1,2-hexanediol galactoside (HD-gal)[12]와 같이 한 분자의 galactose가 결합된 galactoside 유도체와 그렇지 않은 CPN, PE, HD와의 인간 피부세포에 대한 독성을 비교 연구하였다. 그 결과, 합성된 galactoside 유도체(CPN-gal, PE-gal, HD-gal)의 세포 독성이 CPN, PE, HD 보다 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, galactose 유도체가 보다 안전하다는 실험적인 증거를 확인하였다. 본 연구에서도 이러한 결과를 근거로 PhE의 galactoside 유도체인 PhE-gal의 합성 연구를 수행하였다.

Galactoside 유도체(CPN-gal, PE-gal, HD-gal) 합성에는 대장균에서 발현된 β -galactosidase (β -gal)를 사용하였으며, 대장균 세포 안에 발현된 β -gal을 정제하지 않고, whole cell을 효소로서 사용하였다. 본 연구에서도 대장균 효소 β -gal을 이용하여 PhE-gal이 합성될 가능한지를

확인하기 위하여, ^1H - and ^{13}C -NMR (nuclear magnetic resonance) spectroscopy과 mass spectrometry를 이용하여 확인 분석을 수행하였으며, 이러한 연구 결과를 바탕으로 보다 안전하고, 부작용 없는 화장품 및 식품용 첨가 물질 연구를 계속하기 위한 후속 연구를 수행할 예정이다.

2. 실험방법

2.1. 시약

2-Phenylethanol은 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. PhE-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

재조합 대장균에서 β -gal은 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 vector를 가지고 있으며, 발현 숙주와 vector construction에 관한 내용은 선행연구에 자세히 기술하였다[13]. 그리고, 재조합 대장균의 배양방법 등에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기술하였다[13].

2.3. 대장균 β -gal을 이용한 PhE-gal 합성 및 정제

선행연구에서 2-phenoxyethanol의 galactoside 유도체를 대장균 β -gal을 이용하여 합성한 조건으로 PhE-gal을 합성하였다[8,9]. 50 mM phosphate buffer (pH 8.0)를 이용하여 50 ml conical tube에서 300 g/l lactose, 0.96 U/ml β -gal, 1% PhE를 녹인 후, shaking incubator (40°C, 100 rpm)에서 24 시간 동안 반응시켜 PhE-gal을 합성하였다. Silica gel chromatography (이동상, Ethyl acetate: Methanol: Distilled water = 17:2:1)를 이용하여 PhE-gal로 추정되는 물질이 포함된 분획을 모은 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 자세한 조건과 방법은 선행연구에 상세히 기

술하였다[8,9]. 그리고, 이 농축 물질에 대하여 NMR spectroscopy와 mass spectrometry 분석을 실시하였다.

2.4. TLC 분석

20 × 10 cm TLC plate에 1.0 μl 시료를 loading하고 이동상 (Ethyl acetate:Methanol: Distilled water = 17:2:1, (v/v))으로 전개하였다. 그리고 staining solution (1.5 g KMnO_4 , 10 g K_2CO_3 , 1.25 ml 10% NaOH in 200 ml water)를 TLC plate에 뿌린 후, 80°C oven에서 15 분간 말려서 밴드를 확인하였다.

2.5. ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy

효소를 이용하여 합성된 화합물 PhE-gal의 구조를 분석하기 위해 400 MHz NMR Spectrometer (Bruker Ascend 400, Bruker, Germany)를 이용하여 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 얻었다. 이 때, 사용한 solvent는 D_2O 이며, 정제된 PhE-gal 약 20 mg을 1000 μl 용매에 녹여 NMR 시료를 제조하였다.

2.6. Mass spectrometry

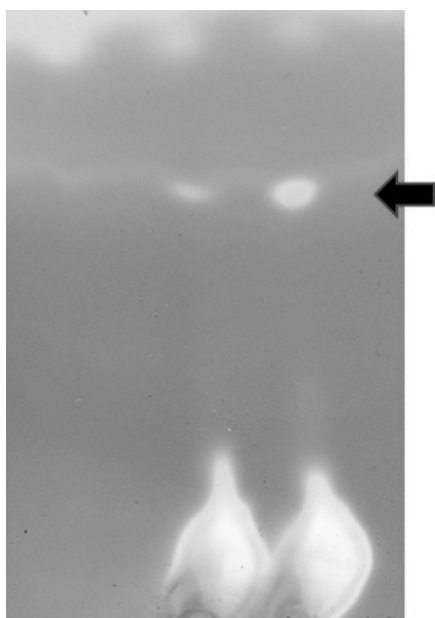
정제된 PhE-gal의 질량 분석은 고분해능 Q-TOF mass spectrometer (MicroQTOF III, Bruker Co.)를 사용하여 실시하였다. Ionization source는 ESI (electrospray ionization)으로, analyze type은 time of flight (TOF)로 물질의 m/z (mass to charge ratio)를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

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

Fig. 2와 같이 합성된 PhE-gal 추정 물질을 TLC로 확인 하였다. 이 물질을 silica-gel chromatography를 이용하여 정제한 후, ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy, 그리고 mass spectrometry 분석을 실시하였다.

PhE-gal의 ^1H NMR 스펙트럼은 PhE에 갈락토실화가 되었음을 보여주는 다양한 피크가 나타나 있다(Fig. 3). ^1H NMR 스펙트럼의 다운필드인 δ_{H} 7.30~7.21 ppm에 나타나는 피크들은 PhE의 방향족 페닐기가 존재함을 나타낸다. 또한 당류에서 특징적으로 나타나는 영역인 δ_{H} 4.31 ppm, 4.07 ppm과 δ_{H} 3.86~3.38 ppm에서 나타

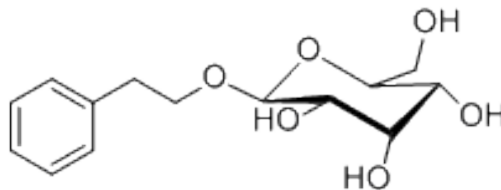


PhE 12 24 (h)

Fig. 2. TLC analysis for PhE-gal synthesis using β -gal, in which 12- and 24-h samples were analyzed. Arrow indicates PhE-gal tentatively. PhE represent 1% standards of 2-phenylethanol.

나는 다수의 proton 피크로부터 당당류가 도입되었음을 확인할 수 있었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 나타난 12개의 탄소 피크 중 4개의 피크는 방향족 고리인 페닐기로부터, 또한 당당류에서 기

인한 6개의 피크가 존재하므로 PhE에 당당이 도입되었음을 알 수 있다. 당과 방향족 알코올과의 반응으로 형성된 PhE-gal의 아세탈 위치의 절대 배열은 β -anomer를 형성하는 것으로 나타났다. 기존 연구로써 CPN, PE, benzyl alcohol과 같은 방향족성 알코올은 효소 β -gal과의 transgalactosylation 반응에 의해 모두 β -anomer만 형성되는 입체특이적인 반응 생성물을 생성하였다[6,7,8,9,14,15]. 그러나 지방족성 알코올인 HD와의 반응은 α -와 β -anomer가 각각 50%씩 합성된 부분입체이성질체의 혼합물로 나타나 입체특이적인 반응을 보이지 않았다[15]. 본 연구의 출발물인 PhE도 방향족성 알코올로써 기존 연구결과와 마찬가지로 한 종류의 입체이성질체인 β -anomer만 특이적으로 관찰되어 모두 일치된 결과를 보이고 있다.



PhE-gal은 ^1H NMR에서 PhE에 갈락토실화가 되었음을 나타낸다. 방향족 고리에서 기인하는 δ_{H} 7.30~7.21 ppm의 5개의 proton 피크와 δ_{H} 2.88 ppm에 나타난 벤질위치의 CH_2 proton 및 $\text{O}-\text{CH}_2$ 로부터 기인하는 2개의 proton 피크로부터 페닐에탄올이 존재함을 알 수 있다. 당당류의 proton들은 지방족 사슬 영역에서 나타나는데,

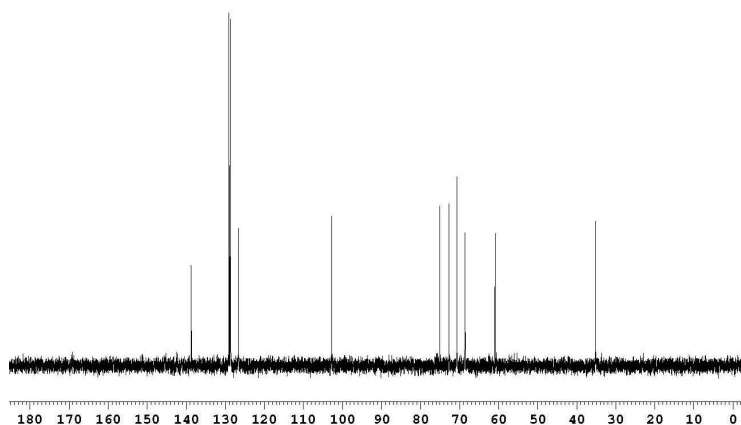


Fig. 3. ^1H -NMR spectrum of PhE-gal.

δ_H 4.31 ppm, 4.07 ppm과 δ_H 3.86~3.38 ppm에서 나타나는 7개의 proton 피크로부터 단당류가 도입되었음을 확인할 수 있다. 1H NMR (400 MHz, D_2O) 7.30~7.26 (m, 4H), 7.25~7.21 (m, 1H), 4.31 (d, 1H, $J=8.0$ Hz), 4.07 (q, 1H, $J=8.0$ Hz), 3.86~3.81 (m, 2H), 3.71~3.62 (m, 2H), 3.58~3.51 (m, 2H), 3.38 (t, 1H, $J=15.8$ Hz), 2.88 (t, 2H, $J=7.0$ Hz).

^{13}C NMR 스펙트럼(Fig. 4)에서 나타난 12개의 탄소 피크 중 138.7 ppm, 129.0ppm, 128.6ppm, 126.5ppm의 4개의 피크는 방향족 고리인 페닐기로부터 기인한다. 또한 단당류에서 기인한 6개의 피크와 PhE의 2개의 CH_2 로부터 지방족 탄소 8개의 피크가 나타나므로 PhE에 단당이 도입되었음을 알 수 있다. ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) 138.7, 129.0, 128.6, 126.5, 102.7, 75.0, 72.7, 70.7, 70.6, 68.6, 60.9, 35.2.

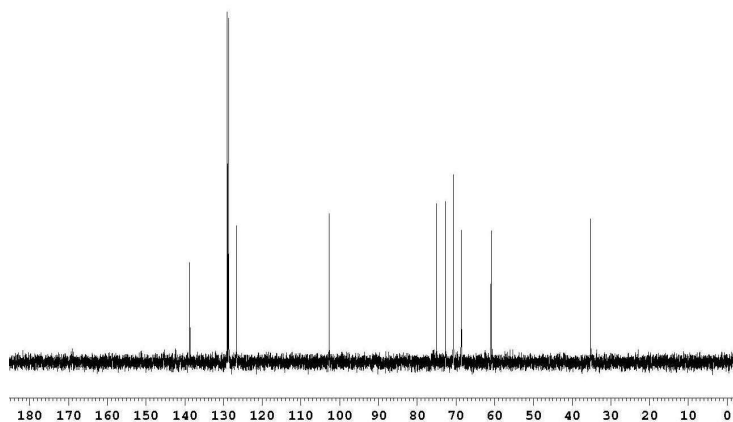


Fig. 4. ^{13}C -NMR spectrum of PhE-gal.

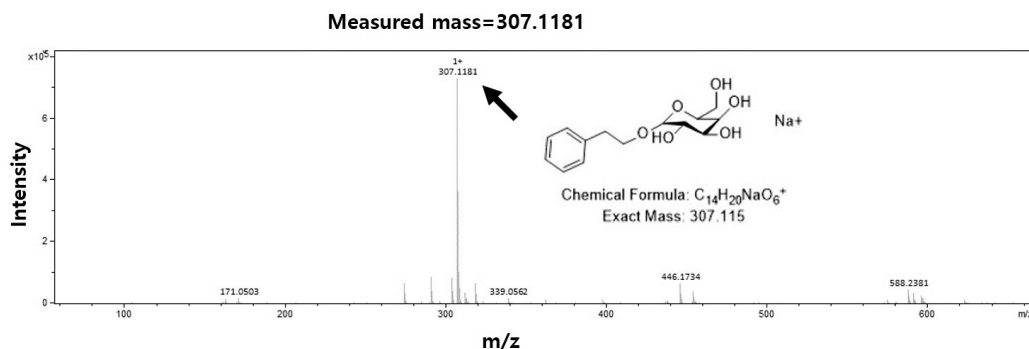


Fig. 5. Mass spectrum of PhE-gal using LC/MS/QTOF. Arrow indicates a peak of sodium adduct ion of PhE-gal ($[M+Na]^+$). In addition, molecular structure of $[M+Na]^+$ is shown beside the arrow.

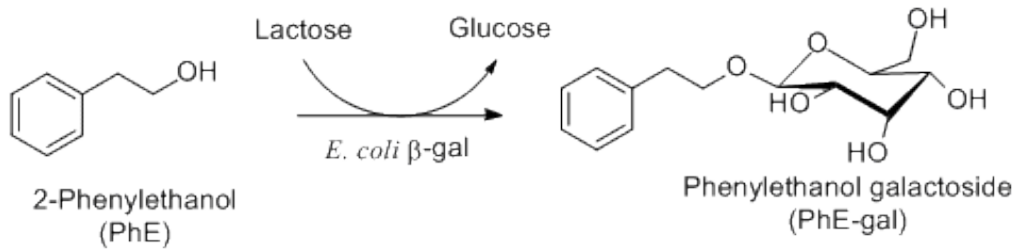


Fig. 6. PhE-gal synthesis using β -gal by transgalactosylation reaction.

4. 결론

대장균 효소인 β -gal을 이용하여 PhE-gal을 합성하기 위하여 transgalactosylation 반응을 실시한 후, PhE-gal 합성 추정 물질을 NMR (^1H - and ^{13}C -) spectroscopy와 mass spectrometry로 분석하였다. PhE의 hydroxyl group (-OH)에 galactose 한 분자를 결합된 PhE-gal의 분자구조와 질량을 확인할 수 있었으며, 이 때, 합성 반응이 Fig. 6과 같은 transgalactosylation 반응에 의해서 일어난다고 추론할 수 있었다. 앞으로 방향족성 알코올과 지방족성 알코올의 transgalactosylation 반응생성물의 입체구조와 메커니즘 연구를 통해 다양한 입체배열을 가지는 생리활성 galactoside 화합물을 합성하는데 기여할 수 있는 연구를 진행할 계획이다.

선행 연구에서 유사한 구조의 PE의 galactoside 유도체인 PE-gal를 본 연구와 같은 효소를 이용하여 방법으로 합성하였다. 이 때, PE-gal의 항균력은 PE과 큰 차이가 없었으며, PE-gal의 인간 피부세포에 대한 독성이 PE와 비교하여, 현저하게 감소되는 것을 관찰하였다[8,9]. 이러한 선행 연구결과를 바탕으로 본 연구에서는 우선 PhE로부터 PhE-gal이 합성되는지를 관찰하는 연구를 수행하였다. 앞으로, PhE-gal의 합성 최적조건 확인, PhE-gal의 분리/정제 연구, 항균력 검증시험과 피부세포 독성 연구 순으로 계속 연구를 진행할 예정이다. 선행연구에 비추어 볼 때, 독성이 감소되고, 항균력은 유지되는 PhE-gal의 특성이 확인될 수 있을 것으로 기대하고 있다.

References

1. J. Scognamiglio, L. Jones, C. S. Letizia, A. M. Api, "Fragrance material review on phenylethyl alcohol", *Food Chem. Toxicol.* Vol.50, S224-S239, (2012).
2. D. Belsito, D. Bickers, M. Bruze, P. Calow, M. Dagli, A. D. Fryer, H. Greim, J. H. Hanifin, Y. Miyachi, J. H. Saurat, I. G., "A toxicologic and dermatologic assessment of aryl alkyl alcohols when used as fragrance ingredients", *Food Chem. Toxicol.*, Vol.50, (Suppl.2), S52-S99, (2012).
3. K. J. Oritiz, J. A. Yiannias, "Contact dermatitis to cosmetics fragrances, and botanicals", *Dermatol. Ther.*, Vol.17, No.3, pp. 264-271, (2004).
4. P. L. Scheinman, "Allergic contact dermatitis to fragrance: A review", *Am. J. Contact Dermatitis*, Vol.7, No.2, pp. 65-76, (1996).
5. A. C. de Groot, P. J. Frosch, "Adverse reactions to fragrances; A clinical review", *Contact Dermatitis*, Vol.36, No.2, pp. 57-86, (1997).
6. 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).

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. 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).
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. 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).
11. Y.-O. Kim, H. Y. Lee, K.-H. Jung, "NMR spectroscopy and mass spectrometry of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -galactosidase", *J. Korean Oil Chemists' Soc.*, Vol.33, No.2, pp. 286-292, (2016).
12. J.-S. Kim, K.-H. Jung, "Cytotoxic effects of 1, 2-hexanediol and 1, 2-hexanediol galactoside on HaCaT", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.44, No.3, pp. 343-347, (2018).
13. 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).
14. Y.-O. Kim, H. Y. Lee, K.-H. Jung, "NMR spectroscopy and mass spectrometry of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -galactosidase", *J. Korean Oil Chemists' Soc.*, Vol.33, No.2, pp. 286-292, (2016).
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).