

Bioconversion 기술에 의한 고부가가치
Bioessential oil 제품개발
Development of high-valued Bioessential oil by
bioconversion technique

연구기관
조선대학교
목포대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "Bioconversion 기술에 의한 고부가가치 Bioessential oil
제품 개발" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 9 일

주관연구기관명 : 조선대학교

총괄연구책임자 : 장 해 춘

연 구 원 : 박 연 진

협동연구기관명 : 목포대학교

협동연구책임자 : 김 인 철

연 구 원 : 강 성 국

위탁연구기관명 : 이화여자대학교

위탁연구책임자 : 김 영 석

요 약 문

I. 제 목

Bioconversion 기술에 의한 고부가가치 Bioessential oil 제품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 연구개발의 필요성

현재의 유자 가공 기술이나 개발된 제품은 이미 새로운 수요를 창출한다는 면에서 그 한계점에 봉착해있다고 판단되며, 새로운 가공제품 및 용도 개발이 이루어지지 않는 한 우리의 특산품인 유자의 전망은 기사위기에 놓여있다. 즉 유자가 다른 작물에 비해 상대적으로 생산비와 노력이 적게 들며 소득율이 상대적으로 높기 때문에 재배 면적과 생산량이 더 늘어나 그 수요를 초과하는 공급사태를 초래하며 유자재배 농가의 부담이라는 문제를 해결하기 위해서는 다양한 가공이나 첨단 생물공학적인 기법을 도입하여 수요개발에 전력해서 지역전체의 부가가치를 높여나가는 것이 유자농가의 활로를 열어주는 길일 것이다.

본 연구는 기존의 유자 가공 방식을 탈피하여 진일보한 고도의 기술을 이용하여 새로운 유자 가공제품의 개발을 이룸과 동시에 기존 유자의 부가가치를 높임으로서, 농가 소득 및 유자의 소비를 촉진할 수 있고, 더 나아가서는 개발된 제품의 수출화를 통하여 우리 농산물의 국제 경쟁력을 높이는데 기여할 수 있는 방안을 모색하고자 한다.

1) 기술적 측면

- 유자에는 비타민 A, C 등의 영양소가 다량 함유되어 있는 것 이외에도 유자 특유의 향을 결정하는 많은 정유성분이 함유되어 있는데, 과피의 건조중량으로 환산했을 때 약 30% 정도의 정유성분을 함유하고 있다. 이 정유성분은 리모넨(limonene)과 같은 monocyclic terpenoid 화합물이며 유자나 오렌지와 같은 감귤류 껍질 정유성분의 공통적인 주요성분으로 약 70-95% 정도를 차지한다.
- 이는 저렴한 가격으로 손쉽게 구할 수 있는 terpene류로서, 많은 식품이나 그 밖의 향료산업에 직접 이용되어 질 수 있을 뿐만 아니라 미생물의 대사 체계를 이용하여 값비싼 다른 향기물질로 전환시킬 수 있는 초기 기질물질로 이용되어질 수 있다.

2) 경제·산업적 측면

- 천연향인 essential oil은 식물체의 부위에 따라 꽃(장미), 잎(바질), 씨앗(fennel), 열매껍질(오렌지), 나무(sandalwood), 나무 껍질(계피), 수지(myrrh)에서 얻어지며 그 양은 각 식물체 부위별로 건물당 1% 이하이며 이를 건조하지 않은 생물로 환산하면 이보다 6-8배 더 수율이 낮아진다. 즉 장미향수 mg을 얻기 위해서 장미꽃이 수 kg이 소요된다는 것이다.
- 그러므로 생물공학적인 방법을 이용하여 쉽게 확보할 수 있는 천연자원을 고부가가치의 향 자원으로 생전환시킬 수 있는 시스템의 개발은 경제적으로 매우 중요한 산업자원 및 기술이 될 것이다.

3) 사회·문화적 측면

본 연구과제는 유자가공 시에 발생하는 폐자원을 활용한다는 사회적인 측면과 퇴비화 등이 어려운 물질을 정제함으로써 환경문제를 해결한다는 환경 친화적인 측면도 가지고 있고, 본 연구의 최종 목적인 여러 유자향을 이용한 가공제품 및 기능성 식품의 개발은 국민의 기호를 충족시킬 뿐 아니라 건강 증진에도 기여할 수 있다. 그리고 새로운 향의 개발은 성공 시 많은 경제적인 이익을 수반하므로, 향의 개발은 국내 뿐 아니라 국외로의 수출도 가능하고, 우리나라의 향 산업에 미치는 영향도 클 것으로 기대된다.

나. 연구개발의 목표

- 본 연구개발의 목표는 미생물의 대사체계를 이용한 Bioconversion 기법으로 유자정유성분으로부터 고부가가치의 다양한 천연의 essential oil 제품 개발에 있다. 그 방법으로는 첫째 유자정유 및 terpene 화합물의 강력한 대사능을 보여주는 균주 및 유전자 재조합체로부터 효율적인 발현시스템 구축, 미생물 생전환 시스템의 안정화, 둘째 고농도 배양 및 특수 bioreactor 제작을 통한 Bioessential oil의 수율 증대 및 공정 확립, 셋째 Bioessential oil 최적 추출 공정 확립 및 총체적인 향 Bioessential oil 내 향기물질 분석으로 구성하였다.
- Bioessential oil 생산을 위한 미생물 생전환 및 발현 시스템의 개발의 목표는 강력한 유자정유 대사능 미생물 및 그 유전자를 확보하고 이를 이용하여 Bioessential oil을 생성할 뿐 아니라 고발현 시스템 하에서 효율적이며 안정되게 특정 향기물질을 생산하는데 있다. 이와 더불어 최종적으로 본 연구결과로 생산된 essential oil 제품의 활용방안의 하나로 제과·제빵의 식

품첨가물(향신료)로서 적용하여 그 가능성을 검증(맛의 향상, 보존성)함으로써 model system을 제시하고자 한다.

- 고농도배양 및 대량 bioconversion system개발의 목표는 특수하게 제작된 bioreactor를 사용하여 투입되는 essential oil에 대하여 bioreactor에서의 생 전환 수율의 극대화를 위한 공정 확립 및 본 회수 공정의 최적화이다. 따라서 “고농도 배양 및 대량 생전환시스템의 개발” 분야는 정유공급용 특수 bioreactor의 제조, 고농도 배양 시 공급되는 oil 양의 최적화 공정 확립, continuous bioconversion process 방법 확립 그리고 생전환 된 essential oil의 회수공정 수립 등을 통하여 최적의 생전환 물질을 제조하는 공정을 확립하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. Bioessential oil 생산을 위한 미생물 생전환 및 발현 시스템의 개발

가. 고발현 시스템 구축

- 고발현용 host-vector system
- 고발현 시스템에서의 균 생육
- 유자정유 대사능 유전자(CD3, CD4, CD6)의 DNA 염기서열 결정
- 유자정유 대사능 유전자의 subcloning 및 상동성 분석

나. 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화

: 유자정유 대사능 유전자의 고발현 시스템에서의 발현

- 최적 생전환 조건 및 대사산물

다. 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의 생산

- 미생물 조향을 위한 미생물 배양
- 향기물질의 조성물 분석

라. 추출기에 의한 Bioessential oil의 추출

- 추출기 제작 및 최적 추출조건 확립
- 추출기를 사용한 미생물 조향 물질의 분석

마. 시작품제작

- 쿠키의 제조
- 마들렌의 제조
- 관능평가

바. 독성실험

- 급성독성실험
- 아급성독성실험

2. 고농도 배양 및 대량 bioconversion system의 개발

가. Bioconversion 용 bioreactor의 제조

- 유자 정유 또는 limonene의 공급 방식 결정
- 유자 정유 또는 limonene의 공급을 위한 device 제작
- 정유의 기체 형태로의 공급용 bioreactor 제작

나. 재조합 대장균 *E. coli* EC3, 4, 6의 고농도 배양 및 *E. coli* EC4의 induction

- 정유 대사 유전자를 함유한 대장균의 고농도 배양 조건 확립
- 배지 조성의 확립
- 고농도 배양조건하에서의 유전자의 induction 유무 결정
- Induction 결과의 유전자 산물에 의한 분석

다. Bioconversion product의 분석

- Bioconversion product의 분석을 위한 SPME 법에 의한 분석
- 유기용매 추출에 의한 bioconversion product의 분석

라. 유자정유의 공급량 결정 : 기체상태로 공급 시 공기량에 대한 유자 정유량의 관계 규명

- 반응조 내에 공급되는 유자정유 또는 limonene 양에 따른 bioconversion yield의 분석
- air와 동시 공급 또는 별도의 air 공급라인으로 공급되는 방식의 효능 검증
- 공급되는 air 양을 0.25, 0.5 그리고 1.0VVM으로 하여 bioconversion yield 분석

마. 생전환시기의 결정

- 시간별로 bioconversion yield를 분석
- 최적의 생전환시기 결정

바. 최적 연속 전환 system 확립

- 균체 배양과 동시에 bioconversion을 진행하는 동시 전환방법 실시
- 균체 배양과 별도로 회수된 세포를 이용한 bioconversion system 정립 및 분석

사. Bioessential oil의 회수 방법 확립

- 생전환물의 효율적인 회수 방법의 정립
- 휘발성 향기 성분에 대한 용해도를 이용한 별도의 포집장치의 개발
- 각 분획별 향기 성분의 분석

아. limonene 및 유자 정유의 생전환물의 분석

- 분획별 정유 전환물의 GC-MS 분석
- 반응액, 1차 에탄올 분획물 그리고 2차 ether 분획물의 GC-MS 분석

자. 시작품의 실험실 규모 제작

- 3종 이상의 Bioessential oil 제조

차. 시작품의 평가 : 관능 및 향균력 평가

- 제조된 3종 이상의 생전환시작품에 대한 품질을 10인의 관능 평가
- 제조된 시작품의 향균력 분석 : 4종의 공시 균주에 대한 향균력 시험

3. 생전환 향기성분의 분석 및 안정성 평가

가. 미생물의 이용하여 생전환시킨 폐유자박의 향기성분 분석 및 안정성 평가

- 미생물 배양액으로부터 향기성분의 효율적인 추출방법 확립
- 생전환 된 폐유자박으로부터 향기성분의 효율적인 추출방법 확립

- 생전환 된 폐유자박 정유성분의 GC, GC-MS, GC-O를 통한 분석
- 동정된 성분 중 주요 향기 성분의 안정성 평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 고발현 시스템 구축

① 고발현용 host vector system

유자정유 대사능 유전자 3종(CD3: 8.6kb, CD4: 4.6kb, CD6: 7.7kb) 고발현 host- vector system에 옮기고 이 고발현 시스템에서 유자정유를 유일한 탄소원으로 하는 배지에서 일반 vector system에서보다 약 10배 이상의 cell mass를 얻었으며, 이때의 성장 곡선 및 최대 성장 조건을 확립하였다.

② 유자정유 대사능 유전자의 분석

본 연구에서의 3종의 유자정유 대사능 유전자는 본 연구팀이 세계 최초로 클로닝 한 유전자이며, 이 유전자를 지닌 미생물의 대사능은 기존의 보고된 terpene화합물 대사능 미생물보다 매우 우수하다. 이 유전자의 DNA 염기서열을 규명하고 그 유전자를 분석하였다. 본 유전자는 terpene화합물을 광범위하게 대사할 수 있는 유전자 서열에 관한 세계최초의 보고이다.

2) 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화

① 유자정유 대사능 유전자의 고발현 시스템에서의 발현

당해연도에 구축된 고발현 시스템 하에서 3종의 유자정유 대사능 유전자들

을 발현시켜 그 최적 생전환 조건확립 및 고발현 시스템 하에서의 생전환 화합물을 분석하였다.

3) Bioessential oil추출 수율증대 공정

전년도에 구축된 고발현시스템 하에서 또는 유자정유대사능이 우수한 모균주와 고발현시스템의 조합에 의하여 유자정유를 생전환시킨 미생물의 배양액으로부터 Bioessential oil을 추출하기 위하여 추출기를 제작하였다. Bioessential oil을 추출하기 위하여 용매추출을 사용한 경우 Bioessential oil추출량은 $1\mu\text{l}$ Bioessential oil/mL배양액 이었으며 소요시간은 6min/mL 배양액 이었다. 당해 년도에 제작된 추출기를 사용하면 Bioessential oil 추출량 $0.04\mu\text{l}/\text{mL}$ 배양액(25배↓) 소요시간은 4.8sec/mL배양액(75배↑)으로 나타났다. 즉 획득한 Bioessential oil 양으로 비교하면 25배 감소하나 시간적으로 보면 75배 이상 빨리 Bioessential oil을 획득할 수 있다. 추출기를 사용하면 용매추출의 가장 큰 단점인 폐유기용매의 발생을 크게 줄일 수 있다는 점에서 미생물 생전환에 의한 Bioessential oil의 산업적 대량생산에서 Bioessential oil을 생산할 수 있는 실질적으로 적용 가능한 방법으로 제안된다.

4) 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의 생산

모균주와 유자정유 대사능 유전자를 지닌 형질전환주(고발현 host-vector system)의 배양액을 적정 비율로 혼합하여 미생물학적조향을 시행하여 그 향기물질을 분석하였다. 각각의 균주를 단독 배양하여 유자정유를 생전환하는 경우에는 linalool, 4-terpineil, α -terpineol이 주화합물로 검출되었으나, 미생물 조향법에 의해서는 carvone이 전체 생전환 화합물의 주종(59~78%) 화합물을 차지하였다. 최종 추출물(Bioessential oil)의 향기도 조향된 시료

와는 다르게 나타나 본 방법에 의하여 보다 다양한 Bioessential oil의 생산이 가능함을 시사하였다.

5) Bioessential oil의 생산 및 식품에서의 응용(시작품제작)

폐유자박으로부터 유자정유를 추출 후 이를 본 관제에서 개발된 유용미생물을 이용하여 Bioessential oil을 생산하였다. 본 과제 수행 중 모균주인 *E. agglomerans* 6L과 그 유전자 단편들을 지닌 수종의 형질전환주를 이용하여 여러 가지 향기를 지닌 Bioessential oil을 제조하였다. 그중 가장 식품(쿠키, 마들렌)에 적용시키기 적합한 향은 모균주인 6L을 이용한 Bioessential oil이었다. 6L에 의해 bioconversion된 Bioessential oil을 이용하여 쿠키 및 마들렌을 제조 시 기호도가 높아 제과, 제빵용 essential oil로 적용하기 적절하였다.

6) Bioessential oil의 급성·아급성 실험

Bioconversion된 Bioessential oil을 식품에 적용하기 위해서 안전성 평가를 수행하였다. 일반적으로 미생물에 의해 생전환된 essential oil은 "natural"로 판정되어 화학적 합성 essential oil 보다는 독성 위험이 낮지만, 본 연구에서의 미생물학적 생전환된 Bioessential oil은 새로운 형태의 Bioessential oil 이므로, 이를 산업화시키기 위하여 안전성평가 자료를 제시하였다.

Mouse를 이용한 급성독성 실험에서는 mouse 체중당(kg) Bioconversion oil 2,000mg에서도 사망례가 관찰되지 않았다. 본 연구에서의 Bioessential oil은 독성 실험에서도 중독 현상이 보이지 않아 LD₅₀치가 2,000mg/kg 이상인 저독성 물질로 판단되었다. 아급성 실험에서도(16.6 mg/kg)중독 현상을 유발하지 않고 안전하게 사용할 수 있는 물질로 추정되었다.

7) Bioconversion 용 bioreactor의 제조

Limonene이나 유자 정유는 자체가 미생물에 toxic하게 작용하기 때문에 고농도 배양 시 배지 내에 직접 공급(direct feeding)이 불가능하므로, 미생물에 해를 주지 않으면서, 탄소원 및 inducing agent로서의 기능을 수행하기 위하여 특수하게 고안된 bioreactor가 요구되며, 이 bioreactor는 gas 상태로 limonene 또는 유자 정유를 연속적으로 공급할 수 있는 시스템으로 구성되어야 한다. 본 과제에서는 이러한 목적 하에 연구수행 내용 및 결과 부분에 제시된 bioreactor를 자체 제작하여 실험에 사용하였다.

8) 재조합 대장균 *E. coli* EC3, 4, 6의 고농도 배양 및 *E. coli* EC4의 induction 형질전환주인 *E. coli* EC3와 EC4는 배양 16시간 이후부터 활발한 세포생장을 이루어 *E. coli* EC3는 33.13 g/L(배양 48시간), *E. coli* EC4는 33.8 g/L(배양 48시간)으로 높은 세포생장을 보였다. 한편 *E. coli* EC6는 다른 형질전환주들에 비해 유도기간이 길었으며 28시간 이후부터 세포생장이 활발하였으며 *E. coli* EC6의 배양 시간과 최대 균체 생산량은 72시간, 35.8 g/L이었다. Limonene에 의한 bioconversion system의 induction을 이루기 위하여 가스 상태로 limonene을 feeding하면서 배양된 대장균 *E. coli* EC4는 최종 균체량은 38.58g/L이었으며, bioconversion system의 유도는 SDS-PAGE 분석과 가스 크로마토그래피로 확인하였다.

9) Bioconversion product의 분석

Reactor내에서의 시간별 반응물의 분석은 SPME 방법을 이용하여 분석하였으며, 반응액과 reactor을 통과하여 -70℃에서 포집된 정유부분은 ether 추출법으로 추출한 다음 분석하였다. 형질 전환주가 생산한 생전환 된 물질중 시간이 지남에 따라서 linalool이 가장 많이 생성되었으며 배양시간

72시간째 최고에 달하였다. 그 외에 4-terpeneol, α -terpineol, nerol, verdiflorol등이 검출되었다.

10) 유자정유의 공급량 결정

기체상태로 공급시 공기량에 대한 유자 정유량의 관계 규명 유자 정유를 미생물에 탄소원 및 bioconversion 대상으로 공급할 때, 액상으로 첨가 시에는 미생물이 사멸하기 때문에 발효조에 첨가되는 공기를 limonene 또는 유자 정유를 1차적으로 통과시킴으로써 발효조에 기체상태로 limonene 또는 유자 정유를 공급하여 목적하는 bioconversion process를 정립하였다.

11) 최적 정유 공급량의 결정

공급되는 air 양을 조절함으로써 bioreactor 내에 공급되는 limonene 또는 유자 정유량을 조절할 수 있었으며, 본 연구 결과 0.25, 0.5, 1.0 그리고 2.0 VVM의 유량으로 정유 공급 시 1.0VVM이 가장 좋은 생전환율을 보였다.

12) 생전환시기의 결정

공기량을 1.0VVM으로 설정하고 limonene 또는 유자 정유를 공급했을 경우, 생전환과 미생물 배양을 동시에 진행했을 경우는 72시간째에 가장 많은 전환율을 보였으나, 미생물의 고농도배양 후에 균체만으로 생전환을 시켰을 경우 96시간의 반응시간에서 가장 좋은 전환율을 나타내었으며, 그 이상의 반응시간에서는 오히려 반응물의 감소하는 경향을 보였으므로 생전환 반응시간은 96시간 부근이 가장 적당하였다.

13) 최적 연속 전환 system 확립

최적 연속 생전환 시스템을 확립하기 위하여 2가지 방법을 사용하였다. 하

나는 균체의 고농도 배양과 더불어 동시에 생전환 반응을 진행하는 것이고, 다른 한 시스템은 고농도 배양이 끝난 후 균체를 일정 농도로 희석한 다음, 배양을 중지한 상태에서 limonene 또는 유자 정유만을 공급함으로써 생전환을 유도하는 시스템을 사용하였다. 각 시스템이 장단점이 있지만 최종 product의 순도 또는 이 물질의 제거라는 측면에서 배양후의 균체를 이용한 일종의 fluid packed reactor 시스템이 보다 적절한 생전환 시스템으로 판명되었다.

14) Bioessential oil의 회수 방법 확립

생전환 된 product를 회수하기 위하여 3가지 방법으로 반응물을 회수하였다. 하나는 reactor내에 잔존하는 반응물을 ether를 사용하여 포집하는 것이고, 나머지 2 방법은 reactor에서 배출되는 반응물을 에탄올 그리고 ether를 사용하여 순차적으로 발생하는 반응물의 용매에 대한 용해도 차를 이용하여 포집하는 방법을 사용하였다. 이중에서 가장 많은 생전환 된 반응물은 reactors내에 잔존하는 반응물질과 ether로 포지집한 경우가 우수하였으며, 특히 ether의 경우 ν -terpinene이 특징적으로 포집되는 경향을 보여주었다.

15) Limonene 및 유자 정유의 생전환물의 분석

Limonene을 생전환 시켜 얻어진 물질 중 trans linalool oxide가 145 mg/L로 가장 많이 검출이 되었으며 4-terpineol은 108 mg/L, linalool은 86 mg/L, linalool oxide는 89 mg/L 그리고 α -terpineol은 6 mg/L였다. 반면 유자정유로부터 생전환되어 얻어진 물질로는 α -terpineol이 273 mg/L로 높으며, trans linalool oxide는 128 mg/L, linalool oxide는 116 mg/L 그리고 4-terpineol은 limonene feeding에서 얻어진 것보다 3배정도 더 많은

298 mg/L로 차이가 났다.

16) 시작품의 실험실 규모 제작

Limonene 및 유자 정유를 생전환하여 각 3종씩 6종의 Bio-essential oil 제조하였다.

17) 시작품의 평가 : 관능 및 향균력 평가

제조된 6종의 생전환시작품에 대한 품질을 10인의 관능 요원을 구성하여 평가한 결과 6종 모두 limonene 또는 유자 정유와는 다른 향으로 평가된 base에 limonene 또는 유자 향에 관한 관능이 느껴지고 있으며, 일부 향은 woody 향을 강하게 느끼는 것으로 분석되었다. 또한 제조된 생전환 물질은 limonene이나 유자 정유 원액보다는 향균력이 감소하였으나 대장균이나 고초균에 대하여는 향균력을 나타내고 있었다.

18) 폐유자박으로부터 정유 성분 추출방법 확립

폐유자박의 정유 성분 추출 시 극성이 낮은 terpene hydrocarbon류에 비해 강한 향 활성을 가지는 산화된 유도체들의 동정을 하기 위한추출방법으로는 기존의 용매추출활성을 가지는 산화된 유도체들의 동정을 하기 위한 추출방법으로는 기존의 용매추출법보다 column chromatography를 이용한 분획 추출법이 더욱 효과적이다. 이를 통하여 생전환 된 폐유자박의 향기성분의 동정 및 정량법을 수립하였으며, 특히 향기활성이 크고 상대적으로 극성이 높은 oxygenated terpenes 류의 동정법을 개선하였다.

19) 폐유자박의 주요 향기 성분들의 안정성

저장온도와 용매에 따른 폐유자박의 주요 향기성분들의 안정성을 평가하

였을 때, 저장온도 45℃에 비해 25℃에서 더 안정하였고, flavoring 용매에 따른 저장 안정성 평가 시 ethanol, propylene glycol에 비해 glycerol에서 안정성이 떨어짐을 확인하였다. 이를 통해 유자 저장 시 품질평가의 지표가 되는 향기성분들의 안정성을 높이기 위하여 적절한 저장온도와 용매의 선택이 요구된다. 이러한 연구 결과는 폐유자박으로부터 생전환 된 향기성분들의 분석법을 수립하여 유사 제품의 품질 평가법에 이용될 수 있으며, 시료간 향기성분들의 정성 및 정량적 차이를 밝히는데 이용될 수 있다. 또한 이들 시료를 제품으로 개발 시 저장에 따른 산화적 변화를 최소화하여 제품의 품질과 유통기간을 증대시키는데 활용될 수 있다.

V. 주요 연구 실적 및 성과

1. 논문게재(SCI)

- 1) Microbial Conversion of (+)-Limonene by an *Enterobacter agglomerans* Isolate. 2003. 13(4): 636-639. *J. Microbiol. Biotechnol.* 게재
- 2) Microbial Conversion of citron(*Citrus Junos*)Peel Oil by *Enterobacter agglomerans*. *J. Microbiol. Biotechnol.*. 2004. 7. 30 : 수정 후 가
- 3) compositional changes of major compounds in citrus peel according to different temperature and solvents during storage. *Flavor and Fragrance Journal* : 투고예정

2. 학술발표

- 1) Cloning and overexpression limonene degrading pathway gene from *E. agglomerans*. 2002. 7. P24-27. GIM(International Symposium on the

Genetics of Industrial Microorganisms)

- 2) Cloning and Overexpression of Limonene Degrading Pathway Gene(pREC3) from *E. agglomerans* 6L. 2003. 6. P8-32. 한국미생물·생명공학회
- 3) Cloning and Overexpression of Limonene Degrading Pathway Gene(pREC6) from *E.cowanii* 6L. 2004. 6. P8-8. 한국미생물·생명공학회
- 4) Bioconversion of Limonene by Recombinant *E. coli* EC4 with high cell Density culture. 2003. 6. P2-43. 한국미생물·생명공학회
- 5) 유자과피의 주요 향기성분의 저장온도와 저장용매에 따른 저장기간별 변화. 2004. 6. P1-9. 한국식품과학회

3. 특허

- 1) 재조합 미생물의 고농도 배양을 이용한 limonene의 생전환물 제조 방법.
특허출원 준비 중

SUMMARY

I. Subject

Development of high-valued Bioessential oil by using Bioconversion technique.

II. Objectives and Significance

The purpose of this study is that production of high-valued Bioessential oils from citron peel oil by using Bioconversion technique. The essential oil extracted from citron can be used not only as basic material in food industries but also starting material of microbial conversion to convert the citron essential oil more valuable natural essential oil which is different characteristic from original citron oil. To achieved the goals, construction of more efficient expression system from the valuable microorganism and its genes, which contained highly citron degrading capability.

Another purpose of subject " Development of high cell density culture and large scale bioconversion system" is as followed. The First purpose is to design and develop special bioreactor for bioconversion of essential oil, the second one is to optimize the high cell density culture conditions in the presence of limonene or citron oil. Because limonene or citron oil is very toxic to the microbe, especially *E. coli*,

fermentation conditions should be determined very carefully. The third purpose is to develop the recovery system of bioconversion products from reactor or gas which was liberated from reactor. and final purpose is to manufacture bio-essential products more than 3 types and evaluate these products by sensory evaluation and antimicrobial activity.

III. Contents and Scope of Research

1. Development of microbial conversion and its expression system for production of Bioessential oil.

A. Construction of high level expression system

- Host-vector system for high level expression
- Cell growth in high level expression system
- Determination of nucleotide sequences of citron degrading genes(CD3, CD4, CD6)
- Subcloning and homology search of citron degrading genes

B. Stabilization of microbial conversion system

- Expression of citron degrading genes in high level expression system
- Optimum condition for bioconversion and its metabolites

C. Production of Bioessential oil by microbial flavor mixing technique

- Microbial cultivation for microbial flavor mixing

- Analysis of flavor compounds
- D. Extraction of Bioessential oil by designed extractor
- Designing of extractor and construction of optimum extraction condition
 - Analysis of microbial mixing flavor compounds by extractor
- E. Demonstration of samples by Bioessential oil
- Cookies
 - Madrens
 - Sensory evaluation
- F. Toxicity test
- Acute toxicity test
 - Sub acute toxicity test
2. Development of high cell density culture and large-scale bioconversion system
- A. Developmnt of bioreactor for bioconversion
- Determination of feeding strategy of limonene or citron oil
 - Manufacture of device for limonene or citron oil feeding
- B. Induction of recombinant *E. coli* EC3, 4, 6 in high cell density culture
- Optimization of high cell density culture conditions

- Optimization of media composition
 - Induction condition of high cell density culture of *E. coli* EC4
 - Analysis of induced gene product
- C. Analysis of bioconversion product
- Analysis by SPME
 - Analysis of ether extract by GC-MS
- D. Determination of essential oil feeding rate
- Analysis of bioconversion yield according to the essential oil feeding rate
 - Comparison of bioconversion yield according to the feeding type
- E. Determination of bioconversion reaction time in bioreactor
- Analysis of bioconversion product according to the reaction time by SPME
- F. Set-up for continuous bioconversion system
- Simultaneous bioconversion system
 - Bioconversion system separated from cell growth
- G. Development of recovery system for bioconverted volatile compounds
- Set-up for high efficient recovery system of bioconversion product
 - Development of collecting device for volatile compounds by using solubility

- Analysis of volatile compound fractionated by solvents

H. Manufacture of bio-essential oil in lab scale

- Manufacture of bio-essential oil more than 3 types

I. Evaluation of bio essential products

- Sensory evaluation
- Antimicrobial activity

3. Analysis of Bioconversion flavor compounds and its stability

A. Analysis of Bioconversion flavor compounds

B. Identification and quantification of the extracted conversion flavor compounds from microbial cultures

C. Stability of bioconversion flavor compounds

IV. Results

1. Development of microbial conversion and its expression system for production of Bioessential oil.

Microorganism, *Enterobacter agglomerans* 6L, which had limonene and citron oil degrading pathway had much higher limonene or other terpene

compounds catabolism. The pathway, encoding citron oil catabolism was cloned as 8.8kb, 4.4kb and 8.2kb chromosomal fragments from 6L into *E. coli* EC3, EC4 and EC6, respectively. The above cloned gene named as CD3, CD4 and CD6. The citron oil degrading genes, CD3, CD4 and CD6 were recloned into high level expression host-vector system, the high expression recombinant cells were designated as ECC3, ECC4, and ECC6, respectively. Constructed recombinants in high level expression system showed $A_{600} \approx 0.8 \sim 1.0$ cell growth (x10 higher than EC system) and its optimal metabolites production time was 12-24hr (x2 reduced time compared with EC system). The cloned citron degrading gene cluster was determined its DNA sequences and limonene degrading (limonene hydroxylase gene) ORF was subcloned by PCR.

Citron oil (72\$/kg) was bioconverted by the constructed microbial conversion system that linalool (198\$/kg), α -terpineol (500\$/kg), and 4-terpineol (500\$/kg). The main product (50% ↑) of citron oil conversion by microbial mixing conversion techniques was carvone and its market-value was 1,472\$/kg.

The microbial conversion system described here provides the basis of a process for the production of unique and high value terpenes from waste materials, such as a pressed citron peel, and thus offers the advantage of naturally sourced ingredients. These naturally occurring materials in citron oil are commonly used as flavoring constituents in food and other application. We demonstrated this Bioconversion oil as a flavor oil in making Cookies and Madeleine in this study.

2. Development of high cell density culture and large-scale bioconversion system

Because limonene or citron oil is toxic to the microbe, it is impossible to feed limonene or citron directly to microbe in the form of liquid as a carbon source. And so, we developed new fermentation device for bioconversion of limonene or citron oil, which device was designed to feed limonene or citron oil in gas state to the bioreactor.

Recombinant *E. coli* EC3,4 and 5 was cultured by using high cell density culture techniques. Final cell mass was 33.13g/L, 33.8g/L and 35.8g/L in case of *E. coli* EC3, 4 and 6, respectively. *E. coli* EC4 was grown up to 38.58g/L when limonene was fed in gas state, Induced gene product by limonene was confirmed by SDS PAGE and analysis of volatile compounds by gas chromatography.

Bioconversion products in bioreactor was analysed by SPME method. Major bioconverted product was linalool and 4-terpineol, α -terpineol, nerol, verdiflorol was detected as minor compounds. Optimal reaction time was 72 hours for bioconversion.

Feeding amount of limonene was determined by analysing bioconversion product. Limonene was fed in gas state to the bioreactor and amount of limonene could be controlled by managing the air supplying rate. Air supply of 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 vvm was tested and 1.0 vvm was most effective amount of air supply for bioconversion.

We developed two types of bioconversion system. The one was that bioconversion was achieved simultaneous with cell growth. The other one

was that bioconversion was achieved after cell growth, i.e. cell which was grown in high cell density culture was collected, washed in distilled water and resuspended in the same volume of distilled water as culture broth. and limonene was fed in this cell suspension in the same physical conditions, temperature and air supplying rate as cell culture. The former bioconversion system was shown that 72hr was best reaction time and linalool was major compound. But the later bioconversion system shown that 96hr was best reaction time and trans linalool oxide was major compound when limonene as fed as precursor. In the aspect of purity of final product, bioconversion system with grown cell in distilled water is better than simultaneous bioconversion with growing cell in culture media.

To recovery bioconversion products, collecting gas device was designed and manufactured. Threer step of fractionation was applied for recovery of bioconversion products. The first bioconversion products was extracted from reaction solution, but most bioconverted products was liberated from reaction solution because continuously limonene or citron gas was fed in the rate of 1.0 vvm with air. These liberated producted was collected in ethaonl and -40°C -precooled ether consecutively. Each fraction was shown different major volatile compounds. Especially ψ -terpinene was collected in ether fraction.

Major bioconverted products of limoneen was trans linalool oxide, 4-terpineol, linalool, linalool oxide, and α -terpineol in amount of 145 mg/L, 108 mg/L, 86 mg/L, 89 mg/L, and 6 mg/L, respectively. Major bioconverted producted from citron oil was 4-terpineol, α -terpineol, trans

linalool oxide, and linalool oxide in amount of 298 mg/L, 273 mg/L, 128 mg/L and 116 mg/L, respectively.

Six bio-essential products was made from limonene and citron oil. The flavor of those product was distinguished from original limonene and citron oil. Especially bio-essential product from ether fraction was flavored strong woody flavor. Also bio-essential product from citron showed antimicrobial activity against *E. coli* and *Bacillus subtilis* but not *Micrococcus luteus* and *Salmonella typhimurium*.

3. Analysis of Bioconversion flavor compounds and its stability test

Volatile components, which were produced by microbial bioconversion of yuzu peel, were extracted and then analyzed by GC, GC-MS, and GC-Olfactometry. The volatile components mainly composed of terpene hydrocarbons and their oxygenated derivatives, including limonene, linalool, linalool oxide, geraniol, terpinene, terpinen-4-ol, and α -terpineol. Compared to the terpene hydrocarbons, the oxygenated derivatives could be more important to the yuzu peel oil bioconverted by microorganism due to their stronger odor notes. The major odor active compounds were described as citrus, fruity, yuzu-like, and sweet, whereas other components had some malodors such as stale, medicinal, and naphthalene-like odor notes. After the major components of yuzu peel oil bioconverted by microorganism were determined, eight compounds (linalool oxide, linalool, limonene oxide, nerol, geraniol, thymol, terpinen-4-ol, and α -terpineol) among them were selected for storage

study. The study investigated the compositional changes in citrus volatile compounds contained in flavoring solvents (ethanol, propylene glycol, and glycerol) at different storage temperatures (25°C and 45°C) for 16 weeks. The amounts of the eight volatile compounds reduced rapidly in glycerol compared to those in ethanol and propylene glycol at both storage temperatures. Among the eight compounds, *cis*- and *trans*-limonene oxides decreased most rapidly in the all flavoring solvents at both temperatures. Especially, it was decreased by over 40 % in glycerol solvent. In addition, some artifacts were formed by oxidation and rearrangement of the eight volatile compounds during storage. They included *cis*- and *trans*-dihydrocarvones, *trans*-carveol, and neral.

V. Recommendation

Developed bioconversion techniques in this project could be applied to promote value of our various natural essential oil product, especially citrus oil from citron and citrus fruit in Jeju Island.

New techniques of high cell density culture which is supplied carbon source in gas state can be applied broadly in fermentation field for degrading or converting of toxic materials.

Mass production of natural, valuable essential oil can be achieved by bioconverting cheap raw essential oil in newly developed fermentation techniques not by extraction from plants.

Core techniques which can supply a carbon source in gas state can be applied other fermentation field.

Possible applied field : food & beverage industry

pharmaceutical industry

cosmetic industry

environmental cleaning business

antimicrobial products

This bioconversion process by newly developed fermentation techniques could be educated to everyone who want to be applied to his own process or business.

Technology Transfer Process of bioconversion technique by fermentation is proceeding with Citron Union in Goheung region.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	35
Section 1. Significance	35
1) Technological aspect	37
2) Economical and industrial aspect	39
3) Social and cultural aspect	40
Section 2. Objective and scope	42
Chapter 2. Conditions for national or international technique development .	45
Chapter 3. Results	49
Section 1. Development of microbial conversion and its expression system for production of Bioessential oil	49
1. Introduction	49
2. Method	52
3. Construction of high level expression system	65
4. Subcloning of citron degrading pathway genes	68
5. Stabilization of microbial conversion system	75
6. Production of Bioessential oil by microbial flavor mixing technique	77
7. Extraction of Bioessential oil by designed extractor	84
8. Demonstration of samples by Bioessential oil	88
9. Toxicity Test	96
Section 2. Development of high cell density culture and large-scale bioconversion system	107

1. Introduction	107
2. Method	109
3. Construction of bioreactor for high cell density culture and high cell density culture	116
4. Optimization of induction condition for high cell density culture and construction of contineous bioconversion process	129
5. Construction of bioreactor system for contineous bioconversion process	141
Section 3. Analysis of Bioconversion flavor compounds and its stability	162
1. Introduction	162
2. Method	164
3. Analysis of Bioconversion flavor compounds	170
4. Identification and quantification of flavor compounds by GC, GC-MS	176
5. Extraction by using silical gel column chromatograph and identification of flavor compounds	186
6. Stability of bioconversion flavor compounds	191
Chapter 4. Contribution in relative rearch filed	205
Chapter 5. Utilization of this study	214
Chapter 6. References	217

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	35
제 1 절 연구개발의 필요성	35
1) 기술적 측면	37
2) 경제·산업적 측면	39
3) 사회·문화적 측면	40
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	42
가. 연구개발 목표와 내용	42
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	45
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	49
제 1 절 Bioessential oil 생산을 위한 미생물 생전환 및 발현 시스템의 개발	49
1. 서론	49
2. 연구수행 방법	52
3. 고발현 시스템 구축	65
4. 유자정유성분 대사능 유전자의 염기서열결정 및 구조유전자의 subcloning	68
5. 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화	75
6. 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의 생산	77
7. 추출기에 의한 Bioessential oil의 추출	84
8. 시제품제작	88
9. 독성실험	96
제 2 절 고농도 배양 및 대량 bioconversion system 개발	107

1. 서론	107
2. 연구수행 방법	109
3. 고농도 배양용 bioreactor 제조 및 고농도 배양	116
4. 고농도 배양시 induction 조건의 최적화 및 연속 생전환 공정 구축	129
5. 연속 생전환 공정용 bioreactor 시스템 정립	141
제 3 절 생전환 향기성분의 분석 및 안정성 평가	162
1. 서론	162
2. 연구수행방법	164
3. 생전환 향기 성분의 분석	170
4. GC, GC-MS에 의한 향기성분의 분석 및 내부표준물질(Internal standard)을 이용한 정량 실험	176
5. Silica Gel Column chromatography를 이용하여 추출, 분획된 향기성분의 동정	186
6. 생전환 향기 성분의 안정성	191
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	205
제 1 절 연도별 연구목표 및 평가 착안점	205
제 2 절 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도	206
제 5 장 연구개발의 활용계획	214
제 6 장 참고문헌	217

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

- 현재 국내의 유자 가공율은 전체 생산 유자의 약 20%정도만이 가공되고 있고, 가공제품도 다양하지 못할 뿐더러 부가가치 또한 낮은 실정이다. 그리고 일부 유자는 가공의 형태가 아닌 착즙 상태로 제조되어 출하되고 있다. 이 경우 유자의 착즙 수율은 10-15%내외로, 중량으로 판단할 때 약 90%정도의 과육 및 과피가 부산물로 남게 된다.
- 국내 유자 재배 현황을 살펴보면, 유자는 특유의 고상한 향으로 초기에는 식용 보다는 관상용으로 재배되어 소량씩 출하되었으나 유자가 함유한 풍부한 비타민C, 구연산 등의 영양학적인 측면과 유자의 향 그리고 유자의 가격이 다른 일반 과일에 비하여 상대적으로 높은 수익성을 보장하였기 때문에 재배농가가 급격하게 증가하여 이에 따른 유자 출하량도 많아지고 있는 실정이다. 전국의 유자 재배 동향을 재배면적의 중심으로 살펴보면 1982년도에 전국 유자 재배 면적은 94ha, 1987년도에는 360ha, 1992년도에는 2,194ha, 그리고 1994년도에는 4,676ha로 지속적인 증가를 보이고 있어 이를 연 평균 증가율로 보면 약 40%를 상회하고 있다. 그리고 전국적인 재배 면적 비율은 최근에 전라남도지역에서 많이 재배되어 1994년도에는 전라남도가 전국 유자 재배 면적의 72.3%를 차지하게 되었다(전남발전 연구원, 1995). 유자의 생산량은 재배면적의 증가와 더불어 재배 기술의 향상으로 재배면적의 증가율보다 빠른 증가율을 보이는데 1994년도 유자 총 생산량은 12,542M/T이고 95년도에는 14,000M/T, 1999년도에는 19,000M/T 그리고 2004년도에는

23,000M/T에 이를 것으로 추정하고 있다.

- 예상되는 유자의 수요와 공급 추세를 비교해보면 절대량을 기준으로 볼 때 2004년까지는 수요가 공급을 앞지를 것으로 전문가들은 예상했고, 2005년에 가면 수요가 공급을 다소 초과 할 것으로 예상하였으나, 1997년도 이후 유자의 생산량은 기후적인 조건과 영농의 다각화로 증가한 반면, 적당한 가공기술의 부재 및 유자에 대한 홍보 부족 등으로 수요와 공급을 초과하여 한차례 유자가격의 하락으로 유자 밭을 갈아엎는 파동을 겪고 있다. 결국 현재의 유자 가공 기술이나 개발된 제품은 이미 새로운 수요를 창출한다는 면에서 그 한계점에 봉착해있다고 판단되며, 새로운 가공제품 및 용도개발이 이루어지지 않는 한 우리의 특산품인 유자의 전망은 기사위기에 놓여있다. 즉 유자가 다른 작물에 비해 상대적으로 생산비와 노력이 적게 들며 소득율이 상대적으로 높기 때문에 재배 면적과 생산량이 더 늘어나 그 수요를 초과하는 공급상태를 초래하며 유자재배 농가의 부담이라는 문제를 해결하기 위해서는 다양한 가공이나 첨단 생물공학적인 기법을 도입하여 수요개발에 전력해서 지역 전체의 부가가치를 높여나가는 것이 유자농가의 활로를 열어주는 길일 것이다.
- 본 연구는 기존의 유자 가공 방식을 탈피하여 진일보한 고도의 기술을 이용하여 새로운 유자 가공제품의 개발을 이룸과 동시에 기존 유자의 부가가치를 높임으로서, 농가 소득 및 유자의 소비를 촉진할 수 있고, 더 나아가서는 개발된 제품의 수출화를 통하여 우리 농산물의 국제 경쟁력을 높이는 데 기여할 수 있는 방안을 모색하고자 한다.

1) 기술적 측면

- 유자에는 비타민 A, C 등의 영양소가 다량 함유되어 있는 것 이외에도 유자 특유의 향을 결정하는 많은 정유성분이 함유되어 있는데, 과피의 건조중량으로 환산했을 때 약 30% 정도의 정유성분을 함유하고 있다. 이 정유성분은 리모넨(limonene)과 같은 monocyclic terpenoid 화합물이며 유자나 오렌지와 같은 감귤류 껍질 정유성분의 공통적인 주요성분으로 약 70-95% 정도를 차지한다(Kieslich et al., 1986).
- 이는 저렴한 가격으로 손쉽게 구할 수 있는 terpene류로서, 많은 식품이나 그 밖의 향료산업에 직접 이용되어 질 수 있을 뿐만 아니라 (Braddock & Cadwallader, 1992) 미생물의 대사체계를 이용하여 값비싼 다른 향기물질로 전환시킬 수 있는 초기 기질물질로 이용되어질 수 있다.
- 유자 정유성분 중의 중요한 향기성분은 d-limonene, ν -terpinene, linalool, camphene, myrcene 그리고 phellandrene 등이 있으며(Miyake et al., 1990; Chung et al., 1998) 이들로부터 얻을 수 있는 유용한 산화 화합물로는 perillyl alcohol, perillylaldehyde, α -terpineol, nerol, cryptone, ν,δ -valerolactone, hydroxycitronellol, cuminol 등이 있다 (Chang & Kim, 2000).
- 이들 향기물질은 천연적으로 감귤류 뿐 아니라 각종 식물체의 꽃, 씨, 잎, 줄기, 뿌리, 껍질 등에 미량씩 함유되어 있으며 식품뿐만 아니라 의약품, 향산업 등에 널리 쓰여지고 있다(Feranoli, 1975).
- 향(flavor & fragrance)의 생산방법은 화학적 합성법에 의한 합성향과 천연물에서 추출한 천연향으로 나눌 수 있다. 합성향은 경제성 때문에 많이 사용되어져왔으나 최근의 환경오염, 이로부터 파생되는 각종 질환이 인간이 만들어 낸 화합물에서 비롯됨이 밝혀진 후 천연물에 대한 기

호가 급격히 증가하고 화학합성에 의한 화합물에 대한 사용규제 등이 법령화되고 있다. 그러나 동·식물로부터 얻어지는 천연향은 시간제한성, 기후·천재지변과 같은 자연의존성, 고비용·고인력 소모 등을 타개할 수 있는 방안으로 미생물에 의한 천연향 생산에 많은 관심이 모아지고 있다. 본 연구에서는 폐자원인 폐유자박 내의 정유성분을 미생물의 대사체계를 이용하여 생전환하여 고부가가치 천연향을 생산하려 한다.

- 유용한 이들 향 화합물을 미생물학적 생전환을 통하여 생물학적으로 생산하려는 노력들이 시도되고 있다(Chang et al., 1995; Chang and Oriel, 1994; Cadwalladar et al., 1989; Dhavlikar and Bhattacharyya, 1996; Rama Devi and Bhattacharyya, 1977a,b; Kraidman et al., 1969; Krasnobajew, 1984; Bowen, 1975). 그러나 이러한 연구들이 여전히 상업적 생산 단계까지 도달하지 못하는 이유는 이들 향 물질의 대부분이 미생물에 대해 toxic하게 작용한다는 것과 대사산물의 종류가 너무 다양하다는 것이다.
- 본 연구팀은 기존의 보고에서보다 limonene 및 유자정유에 대해 30-40 배 높은 저항성 및 우수한 대사능(유자정유가 유일한 탄소원인 최소배지; A_{600} : 4.3)을 보이는 우량균주를 보유하고 있고, 이로부터 perillyl alcohol, perillylaldehyde, α -terpineol, nerol, cryptone, γ -valerolactone, hydroxycitronellol, cuminol 등의 고부가가치 향화합물을 생산함을 보고한 바 있다(Chang & Kim, 2000). 또한 이 균주는 limonene 단일성분 뿐만 아니라 유자정유 성분내의 다양한 monoterpene류들을 대사할 수 있음을 보여주었다. 이제 그 기초연구 단계에서 상업적 활용 가능성을 강력히 보여준 이 우량균주 및 유전자 재조합 형질전환체와 생물학적 전환 공정을 이용하여 산업화 단계 진입을 위한 보다 효율적인 미생물의 발현시스템, 미생물 시스템의 안정화, 특수배양법을 통한 수율 증대

및 공정 확립에 대한 연구 개발이 필수적으로 수반되어야 할 것이다.

2) 경제 · 산업적 측면

- 천연향인 essential oil은 식물체의 부위에 따라 꽃(장미), 잎(바질), 씨앗(fennel), 열매 껍질(오렌지), 나무(sandalwood), 나무 껍질(계피), 수지(myrrh)에서 얻어지며 그 양은 각 식물체 부위별로 건물당 1% 이하이며 이를 건조하지 않은 생물로 환산하면 이보다 6-8배 더 수율이 낮아진다. 즉 장미향 수 mg을 얻기 위해서 장미꽃이 수 kg이 소요된다는 것이다.
- 현재 향산업 시장은 선진외국이 주도하고 있으며 1999년 순위 10위권까지의 향 회사가 올린 총매출은 \$83억에 이르며 이 중 1, 2위에 해당하는 IFF(International Flavors & Fragrance Co.)와 Givaudan은 각각 \$14억에 해당하는 매출과 함께 매년 10% 정도의 매출 성장을 기록하고 있다.
- 이들 기업의 제품 출하 형태를 살펴보면(1987년 기준) 다양한 포장 단위의 fragrance compounds 33.6%, flavor compounds 32.8%, aroma chemical 17.9%, essential oil 및 기타 천연물(natural products) 형태로 15.7%를 출하를 하고 있으며 이러한 향 제품은 fragrance compounds의 경우 비누나 세제(34%), 화장품이나 목욕용품(25%), 기타(41%), flavor compounds의 경우 음료(31%), 조미첨가물(23%), 유제품(14%), 기타(32%)에 이용되고 있다. 그리고 무엇보다도 중요한 사실은 이들 굴지의 기업들이 생산하는 위와 같은 향 관련 상품의 조성물이 천연물로 대체되고 있고 이들의 판매전략 중 자사의 상품이 천연물임을 강조한다는 것이다.

- 미국의 “The Herbs Place”라는 향 회사는 다양한 essential oil을 판매 하는데 이곳은 자사제품이 모두 천연향 입을 슬로건으로 내걸고 5ml 포장 단위를 \$5-50 수준으로 판매하고 있다.
- 그러나 천연향은 대부분 식물체에서 추출한 것들인데 식물을 재배하고 이로부터 추출까지는 시간적, 공간적, 인력공급상의 제한성이 있다. 이를 극복할 수 있는 좋은 방법 중 하나가 미생물을 이용한 향기물질 생산일 것이고 이로부터 대량 생산만 이루어진다면 차세대 천연 향기물질 생산방법임에 분명하다. 이미 Givaudan을 필두로 세계 10위안의 향 관련 기업은 이 부분에 많은 관심과 실용화를 위한 연구투자를 시행하고 있으며 이 중에는 일본회사도 두개나(Takasago Company, T. Hasegawa Company) 포함되어 있다. 국내에서 향 전문회사로는 (주)한 불화농이 있고 연간 매출액 133억원 규모로 프랑스 Sicalavde Haute Provence와 합작 법인회사이다.
- 향 산업의 세계시장 현황을 살펴보면 북미 32%, 남미 6%, 서유럽 25%, 동유럽 5%, 아시아·태평양지구 26%, 동아시아와 아프리카 6%이다. 그러므로 본 연구가 성공적으로 마무리되면 막대한 그 시장성을 고려할 때 수입대체, 유망수출기대 품목이 될 것이다.

3) 사회·문화적 측면

- 일본인의 유자에 대한 인식은 한국인처럼 차나 건강식품으로 생각하기 보다는 음식에 필요한 조미료로 인식되고 있어 유자가 조미료 가공품으로 제조되어 소비자에게 유통되고 있으며, 목욕을 즐기는 일본인의 풍습에 따라 유즈브로(목욕탕의 향료로 사용되는 유자)로서도 널리 이용되어 우리나라보다 유자의 소비패턴이 다양하다.

- 또한 미국의 경우는 일찍부터 개발된 선진과학기술을 도입하여 폐자원으로 방출되는 오렌지껍질의 정유성분을 고부가가치의 산물로 전환하려는 시도를 하여 이미 이와 관련된 분야의 국제 특허 등을 확보하여 여기에 대한 소유권을 확보하고 있다.
- 이러한 국제 실정에 비하여 국내의 유자 소비 형태는 대부분 1차 가공 부문에만 국한되어 있다. 현재 우리는 상당히 심각한 대내외적인 문제에 직면하고 있다. 안으로는 어려운 경제 현실과 더불어, 대외적으로는 UR 농산물 무역협정의 타결로 인한 WTO 체제의 출범, 한미 통상마찰 등 우리의 생존을 위해 넘어가야만 하는 많은 과제를 안고 있다. 특히 농산물 수입개방화 정책으로 인하여 우리 농산물은 과거의 1차 가공품으로서 냉엄한 시장경제 하에서 경쟁력을 확보하는 것이 이미 한계점에 이른지 오래되었다. 그러므로 새로운 가공 제품의 개발 및 고부가가치 상품의 창출은 반드시 우리 해결해야 될 과제라고 생각된다.
- 본 연구과제는 유자가공 시에 발생하는 폐자원을 활용한다는 사회적 측면과 퇴비화 등이 어려운 물질을 정제함으로써 환경문제를 해결한다는 환경 친화적인 측면을 가지고 있고, 본 연구의 최종 목적인 여러 유자향을 이용한 가공 제품 및 기능성 식품의 개발은 국민의 기호를 충족시킬 뿐 아니라 건강 증진에도 기여할 수 있다. 또한 유자 정유의 자원화는 새로운 개념의 유자 소비로써, 본 과제 성공 시에 국내에서 생산되는 상당량의 유자를 소비할 수 있을 것으로 기대한다. 그리고 새로운 향의 개발은 성공 시 많은 경제적인 이익을 수반하므로, 향의 개발은 국내 뿐 아니라 국외로의 수출도 가능하고, 국내 향 산업에 큰 영향을 미칠 것으로 기대된다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발 목표와 내용

본 연구개발의 목표는 미생물의 대사체계를 이용한 Bioconversion 기법으로 유자 정유성분으로부터 고부가가치의 다양한 천연의 essential oil 제품 개발에 있다. 그 방법으로는 첫째 이미 보유하고 있는 유자 정유 및 terpene 화합물의 강력한 대사능을 보여주는 균주 및 유전자 재조합체로부터 효율적인 발현시스템 구축, 미생물 생전환 시스템의 안정화, 둘째 고농도 배양 및 특수 bioreactor 제작을 통한 Bioessential oil의 수율 증대 및 공정 확립, 셋째 Bioessential oil 최적 추출 공정 확립 및 총체적인 향 Bioessential oil 내 향기 물질 분석으로 구성하였다. 최종적으로 본 연구결과로 생산된 essential oil 제품의 활용방안의 하나로 제과·제빵의 식품첨가물(향신료)로서 적용하여 그 가능성을 검증(맛의 향상, 보존성)함으로써 model system을 제시하고자 한다.

목표 1) 재조합 미생물의 발현 시스템 최적화

- 고발현 시스템에서 유자정유 대사능 유전자의 발현
 - 숙주세포, 고발현 벡터 개발
 - 각기 다른 유자정유 대사능 유전자 단편(8.8, 4.6, 8.2kb)의 조합에 의한 최적 발현
- 정유 성분의 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화
 - 고발현 숙주, vector 시스템에서의 생전환 효율 분석
 - Wild type 유전자 재조합체들 최적 생전환 조건 확립

- 생전환 Bioessential oil의 분석법 개발
- 생전환 균주에 대한 특허 출원

목표 2) Bioessential oil의 추출 수율 증대 공정 확립

- 생전환 된 essential oil 추출 공정 확립
 - Steam distillation(w/ ice cold water 응축)
 - Bioessential oils & Hydrosols(floral water) 생산
- 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의 생산
 - Wild type 및 유전자 재조합체들의 단독·공동배양에 의한 조향
 - 향기물질의 조성물 비교 분석
- 추출된 Bioessential oils & Hydrosol의 향기 성분 분석
- 추출된 Bioessential oils의 식품에서의 응용: 제과·제빵의 향신첨가물
- Bioessential oils & Hydrosols 제법 특허 출원

목표 3) 재조합 대장균의 고농도 배양

- pH-stat 조절방식에 의한 재조합 대장균의 고농도 배양
- Carbon source : glucose, Nitrogen source : NH_4Cl

목표 4) Bioreactor 제조

- Aeration시 pure air와 정유를 gas 상태로 공급
- Air separator를 이용하여 공급되는 정유양을 조절
- 최적 정유 공급량을 농도별로 실시하여 결정
- GC 분석에 의한 정유 공급량 대비 bioconversion rate를 분석
- Bioreactor에 대한 특허 출원

목표 5) Bioconversion product의 회수 공정 확립

- 발효 후 방출되는 air에 bioconversion product 함유
 - cold water system : Bioessential oil & Hydrosol 동시 회수
 - cold trap system : 순수한 Bioessential oil 회수
- GC-Mass analysis : 최종 성분 분석
- 시작품 제작

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

- 국내에서는 유자관련 연구가 유자차나 유자 잼 제조 등의 1차 가공과 관련된 내용이 대부분이고, 유자의 정유성분이나 기타 수용성 향기 성분들에 대한 분석에 관한 몇 건의 보고가(정 등, 1998; 이 등, 1987; 이와 박, 1980) 있으나 유자정유 성분의 주조를 이루는 monoterpenes를 미생물학적으로 생전환 시키려는 시도는 거의 알려진 바 없다.
- 이에 비해 선진 외국에서는 여러 건의 연구보고(Chang et al., 1995; Chang and Oriel, 1994; Cadwalladar et al., 1989; Dhavlikar and Bhattacharyya, 1996; Rama Devi and Bhattacharyya, 1977a,b; Kraidman et al., 1969; Krasnobajew, 1984; Bowen, 1975)가 있으며 그 내용을 간단히 요약하면 다음과 같다. 감귤류 껍질(유자, 오렌지, 자몽 등)에 공통물질로 존재하는 정유성분인 limonene을 여러 가지의 향기 성분으로 생전환 시킬 수 있는 미생물을 선별하고, 이 미생물이 limonene을 유일한 탄소원으로 이용하여 생산한 각종 대사산물이 어떠한 향기성분들인가를 알아보는 내용들이다. 이들 보고에 의하여 중온성 균 중에서는 *Pseudomonas*, *Cladosporium*(Kraidman et al., 1969; Mukherjee et al., 1973), *Penicillium*(Rama Devi & Bhattacharyya, 1977a,b; Bowen, 1975), *Diplodia*(Abraham et al., 1984), *Corynespora*(Abraham et al., 1984)속들이 알려지고 있으며 고온성 균 중에서는 *Bacillus stearothermophilus* (Chang & Oriel, 1994; Chang et al., 1995)에 의한 보고가 있다.
- 그러나 자연계에 분포하는 야생균주로부터 limonene의 생전환 체계는 그 대사산물의 생산량이 소량이고 대사체계가 불안정하다는 문제점을

안고 있다. 그러므로 분리된 야생 균주로부터의 limonene 생전환능 유전자 조절을 보다 용이하게 하기 위하여 유전자를 대장균으로 클로닝하고 그 재조합체 대장균이 야생 모균주 보다 안정되게 고부가가치의 향기성분(perillyl alcohol, perillylaldehyde, perillic acid)을 더 많이 생산하는데 성공하였으며, 유전자 조작까지 이어진 연구로는 위의 보고가 (Chang & Oriel, 1994; Chang et al., 1995) 처음 발표된 내용이다. 위 연구는 미국 농무성(USDA)연구비로 수행되었으며, 본 연구계획의 책임자가 위 연구의 주 연구자(project leader)로 실행한 연구였다.

- 그러나 위 연구 결과로 국제특허 등록을 마쳤지만 모든 특허권이 미국에 귀속되므로 우리가 이를 이용할 수 없다는 것이다. 각종 과학의 발달과 함께 생물공학적 기법을 이용하여 유용한 미생물에서부터 유용한 유전자를 확보하는 것이 그리 어려운 일이 아닌 것이 된 현 시점에서, 먼저 좋은 아이디어로 시작한 팀이 특허 등의 수단으로 지적소유권을 확보하게 되면 후발팀은 높은 기술이전료를 지불하는 부담을 안게 되고 이는 국가 경쟁력 상실이라는 문제로 다가올 것이다.
- 기존의 향기물질이 대부분 값싼 화학적 합성에 의해 생산된 것에 반하여, 최근 Givaudan이나 IFF(International Flavors & Fragrance Co.)등의 세계 향시장 주도 기업들의 기업 신조가 “more odour, less chemistry”일 만큼 천연향에 대한 수요 및 생산이 급증하고 있다.
- 미생물에 의해 생전환 된 향기물질은 천연향이라는 의미에서 합성향과는 그 차원을 달리하고, 현재 천연향을 얻는 식물체 추출법의 단점 및 한계를 극복하고, 다양한 정유성분 대사능 유전자 조합에 따라 특정 정유성분을 기질로 하여 다양하고 유용한 정유성분의 생산이 가능하므로써 짧은 시간 안에 부가가치를 높이는 방법임에 분명하다.
- 현재까지의 미생물에 의한 flavor compounds의 bioconversion system

은 실용화된 예가 없기 때문에 본 과제에서 수행하고자하는 bioreactor 및 product 회수 방법은 지적재산권의 확보 및 타 분야로의 응용범위가 넓을 것이다.

■ 국내·외 관련기술의 문제점

□ : 기 확보 , □ : 수행 예정

기술	현 기술 수준	문제점	본 연구에서 보완 내용
○ monoterpene류의 정유 대사능 미생물 screening	- 중온성, 고온성 등 다수의 미생물 확보 (<i>Pseudomonas Cladosporium, Penicillium, Diplodia, Corynespora, Bacillus stearothermophilus</i>)	- monoterpene류의 항미생물작용(antimicrobial)으로 낮은 생육도(낮은 저항성 & 낮은 대사능) - 정유성분이 유일한 탄소원인 최소배지에서(액체배양) 생육↓ : scale up 불능 - 대사산물의 잡다성	- 유자정유성분(monoterpene)에 높은 저항성과 우수한 대사능을 지닌 우량 미생물의 확보 (<i>E. agglomerans</i>) (limonene이 유일한 탄소원인 배지; A ₆₀₀ : 4.3) (유자정유(mixture of monoterpene)가 유일한 탄소원인 배지; A ₆₀₀ : 4.3)
○ 유자정유 대사능 유전자의 확보	- <i>B. stearothermophilus</i> BR388로부터 9.6kb 클로닝	- 여전히 낮은 균의 생육도	- <i>E. agglomerans</i> 로부터 3개의 유전자 단편 클로닝(8.8, 4.6, 8.2kb) - 비교적 높은 생육도 - 모균주보다 빠른 대사속도(12h 만에 product 회수 가능) - 각 형질주마다 다른 향기물질 생산
○ 폐유자박으로부터 정유추출	- 용매추출법(oleoresin)	- 순수 정유 아님(향을 포함한 수지)	- Steam distillation(순수 유자정유 회수, 수율: 생물 중량의 1.5%)
○ 모균주 및 각각의 유전자 재조합 형질 전환주를 사용한 bioessential oil 생산(미생물학적 조향)	- 보고된 바 없음		- 각기 다른 균체를 사용하여 미생물학적 생전환 기법으로 다양한 향기의 Bioessential oil 생산(미생물학적 조향 기법 제시)
○ Bioessential oil 추출 공정	- 식물체로부터 추출 - Steam distillation - CO ₂ extraction (supercritical, critical) - Freeze dried	- 각각의 방법에 장·단점이 있으므로 추출되는 식물체에 따라 적절한 방법 사용	- 기존의 steam distillation에서 변형된 추출 공정 사용 → Bioessential oil과 부산물로 Hydrosols(floral waters) 획득
○ Inducer로서 gas를 feeding하는 고농도 배양 공정	- 고농도 배양시 inducer는 용액상태로 공급하거나, 배양 조건(온도 등)을 조절하여 induction을 실시	- 기존의 방법은 기질이 안 전하고, 농도만을 조절하면 되기 때문에 본 과제에는 적용이 안됨	- 특수한 고농도 배양용 bioreactor 제작 - 기체상태로 inducer이자 기질을 공급
○ 고농도 배양상태에서의 gas bioconversion 공정	- 현재까지 실시된 바 없음	- bioconversion product가 휘발성이므로 이를 효과적으로 포집할 수 있는 system이 필요	- 반응 산물의 효과적 포집 cold water 또는 -20℃의 condenser 사용

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 Bioessential oil 생산을 위한 미생물 생전환 및 발현 시스템의 개발

1. 서론

가. 국내외 관련분야의 환경변화

- 국내에서는 유자관련 연구가 유자차나 유자 잼 제조 등의 1차 가공과 관련된 내용이 대부분이고, 유자의 정유성분이나 기타 수용성 향기 성분들에 대한 분석에 관한 몇 건의 보고가(정 등, 1998; 이 등, 1987; 이와 박, 1980) 있으나 유자정유 성분의 주조를 이루는 monoterpenes를 미생물학적으로 생전환 시키려는 시도는 거의 알려진 바 없다.
- 이에 비해 선진 외국에서는 여러 건의 연구보고(Chang *et al.*, 1995; Chang and Oriol, 1994; Cadwalladar *et al.*, 1989; Dhavlikar and Bhattacharyya, 1996; Rama Devi and Bhattacharyya, 1977a.b; Kraidman *et al.*, 1969; Krasnobajew, 1984; Bowen, 1975)가 있으며 그 내용을 간단히 요약하면 다음과 같다. 감귤류 껍질(유자, 오렌지, 자몽 등)에 공통물질로 존재하는 정유성분인 limonene을 여러 가지의 향기 성분으로 생전환 시킬 수 있는 미생물을 선별하고, 이 미생물이 limonene을 유일한 탄소원으로 이용하여 생산한 각종 대사산물이 어떠한 향기성분들인가를 알아보는 내용들이다. 이들 보고에 의하여 중온성 균 중에서는 *Pseudomonas*, *Cladosporium*(Kraidman *et al.*, 1969; Mukherjee *et*

al., 1973), *Penicillium*(Rama Devi & Bhattacharyya, 1977a,b; Bowen, 1975), *Diplodia*(Abraham *et al.*, 1984), *Corynespora*(Abraham *et al.*, 1984)속들이 알려지고 있으며 고온성 균중에서는 *Bacillus stearothermophilus*(Chang & Oriel, 1994; Chang *et al.*, 1995)에 의한 보고가 있다.

- 그러나 자연계에 분포하는 야생균주로부터 limonene의 생전환 체계는 그 대사 산물의 생산량이 소량이고 대사체계가 불안정하다는 문제점을 안고 있다. 그러므로 분리된 야생 균주로부터의 limonene 생전환능 유전자 조절을 보다 용이하게 하기 위하여, 유전자를 대장균으로 클로닝하고 그 재조합체 대장균이 야생 모균주 보다 안정되게 고부가가치의 향기성분(perillyl alcohol, perillylaldehyde, perillic acid)을 더 많이 생산하는데 성공하였으며, 그 유전자를 클로닝하고 유전자의 염기서열을 규명한 연구는 미국 미시간 대학의 Dr. Oriel 팀의 연구가 유일한 보고이다(Chang & Oriel, 1994; Chang *et al.*, 1995; Chung & Oriel, 2000). 이 유전자는 limonene만을 대사할 수 있는 limonene hydroxylase gene 으로 규명되었다. 위 연구는 미국 농무성(USDA) 연구비로 1992년부터 현재까지 수행되고 있다.
- 최근 들어 천연향에 대한 관심이 고조되면서 본 과제가 수행되기 시작한 1년 전에 비하여 다양한 형태의 제품 및 이를 제조 및 판매하는 회사가 증가하고 있는데, 천연향은 특히 아로마테라피와 관련된 기능성에 관한 관심이 증가하고 있는 상태이다. 예를 들면 모던스킨(<http://www.modernskin.com/>)이라는 회사는 주로 천연향수 및 아로마테라피 제품을 판매하며, 월드라인(<http://www.world-line.com/>)이라는 회사는 천연향을 섬유류에 첨가한 향기 나는 섬유 제품 및 천연향 자체를 판매하고 있다. 또한 방향제의 일종으로 최근에는 전자동-향기분사

기의 보급이 증가하고 있는데 향기사랑(<http://www.hglove.com/>)이라는 업체에서 제품을 출시하여 좋은 호응을 얻고 있다. 이처럼 향에 대한 관심 및 개발되는 제품의 수가 증가하기 때문에 본 과제에서 추구하는 고가의 천연향을 미생물을 이용하여 대량생산하고자 하는 시스템은 향후 점점 그 중요도가 증가할 것이다.

- 본 연구에서는 기존의 보고에서보다 limonene 및 유자정유에 대해 30-40 배 높은 저항성 및 우수한 대사능(유자정유가 유일한 탄소원인 최소배지; $A_{600} : 4.3$)을 보이는 우량균주 및 그 유전자를 보유하고 있고, 이로부터 고부가가치 향화합물을 생산함을 보고한 바 있다(Chang & Kim, 2000). 또한 이 균주는 limonene 단일성분 뿐만 아니라 유자정유 성분내의 다양한 monoterpene류 등을 대사 할 수 있음을 보여주었다. 이제 그 기초연구 단계에서 상업적 활용 가능성을 강력히 보여준 이 우량균주 및 유전자 재조합 형질전환체와 생물학적 전환 공정을 이용하여 산업화 단계 진입을 위한 보다 효율적인 미생물의 발현시스템, 미생물 시스템의 안정화, 특수배양법을 통한 수율 증대 및 공정 확립에 대한 연구 개발을 수행하고자한다.

2. 연구수행 방법

1) 고발현 시스템 구축

① host-vector

본 연구팀이 이미 확보하고 있는 강력한 유자정유 생전환능 미생물 *E. agglomerans* 6L과 그로부터 유자정유 생전환능 유전자를(CD3, CD4, CD6) 클로닝한 유전자 재조합 균주들로부터(EC3, EC4, EC6) 고발현 시스템을 구축하였다. 고발현용 숙주세포는 *E. coli* BL21(DE3)를, 벡터로는 pET29b(+)를 사용하여 CD3(8.5kb), CD4(4.6kb), CD6(7.7kb)의 유전자를 클로닝하여 유전자 재구성을 시행하였으며(pETC3, pETC4, pETC6), 이를 *E. coli* BL21에 형질전환 시켰다(ECC3, ECC4, ECC6).

② 고발현 시스템에서의 균 생육(ECC3, ECC4, ECC6)

고발현 균주인 ECC3, ECC4, ECC6를 limonene 또는 유자정유가 유일한 탄소원인 M₉최소배지에서 성장 곡선을 측정하였으며 0.01~0.075mM IPTG induction하에서 cell growth를 측정하여 최대 cell growth를 얻기 위한 최적 배양조건을 구하였다.

2) 유자정유성분 대사능 유전자의 염기서열결정 및 구조유전자의 subcloning

① 유자정유 대사능 유전자(CD3, CD4, CD6)의 DNA 염기서열 결정

3종의 유자정유 대사능 유전자 단편을 Sanger의 dideoxy 방법을 사용하여 ABI Prism과 Bigdye Terminator Cycle Seqencing Kit을 이용하여 DNA

염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 Blast program을 사용하여 유전자 분석을 시행하여 Open reading frame(ORF) 구성과 기존의 유전자들과의 상동성 분석을 시행하였다.

② Subcloning

가. PCR

- 클로닝 된 3개의 유자정유 대사능 유전자 cluster(CD3, CD4, CD6)는 염기서열 결정분석에 따라 CD3는 4개의 ORF를 CD4는 3개의 ORF, CD6는 2개의 ORF를 각각 지니고 있는 것으로 분석되었다. 이 각각의 ORF중 limonene degrading gene (limonene hydroxylase gene)이 어느 것인지를 알아내기 위하여 각각의 유전자 cluster를 subcloning하였다.
- Subcloning은 PCR을 통하여 ORF 단편을 떠낸 후 CD3과 CD6는 전기영동을 통한 정제 후 바로 pGEM T-easy vector(promega, USA)에 삽입하여 ligation시켰다. CD4는 PCR 수행시 ORF1은 *Hind*III, *Sal* I site를 ORF2는 *Eco*R I, *Pst* I site를 ORF3는 *Pst* I, *Bam*H I site를 각각 각 ORF단편의 양 말단에 만들어 주었다. PCR이 끝난 각각의 ORF는 전기영동을 통한 정제 후 pUC18/*Hind*III & *Sal* I or *Eco*R I & *Pst* I or *Pst* I & *Bam*H I digestion 된 vector에 ligation 시켰다. 각각의 ligation mixture를 *E.coli* TG1을 숙주세포로 하여 transformation을 수행 하였다.
- CD3, CD4, CD6의 ORF를 분리해내기 위해 사용된 PCR용 oligonucleotide 서열은 Table 1-1~1-3와 같다.

Table 1-1. CD3 primers designed in this study.

CD3		Sequence	Length
ORF1	Forward	GGATCCGCAATGACGCAAGAT	21mer
	Reverse	GTCGACTTAGCGGTGGATGG	20mer
ORF2	Forward	CTGCAGAATGTCTGCGAATAC	21mer
	Reverse	GAATTCATTTATGACTCCCGG	21mer
ORF3	Forward	GAATTCATAAATGAAAAAGACGCA	24mer
	Reverse	GGATCCTCAGGCCACGGCT	19mer
ORF4	Forward	CTGCAGGGTGTGCGATGACG	20mer
	Reverse	AAGCTTGGGGTTAGAGGGACT	21mer

Table 1-2. CD4 primers designed in this study.

CD4		Sequence	Length
ORF1	Forward	<u>AAGCTT</u> TATGCAACACTCCACT <i>Hind III</i>	21mer
	Reverse	GTCGACTCAGGCGACCGC <u>Sal I</u>	18mer
ORF2	Forward	GAATTCATGGCGAAAGCACGC <i>EcoR I</i>	21mer
	Reverse	CTGCAGTCACCGCAGTGAAGT <i>Pst I</i>	21mer
ORF3	Forward	GGATCCATGCAGATTGTGCGT <i>BamHI</i>	21mer
	Reverse	CTGCAGCATCACACTGTGCG <i>Pst I</i>	20mer

Table 1-3. CD6 primers designed in this study.

CD6		Sequence	Length
ORF1	Forward	TATATCAGACACGGATCTTCC	21mer
	Reverse	GCAACAATGTTACTCAATATCG	22mer
ORF2	Forward	AAGGAATATGAGTATGCAGCG	21mer
	Reverse	CCATCAGCGTATCTGGTCC	19mer

- CD3, CD4, CD6의 각 ORF를 subcloning하기 위한 ORF DNA 단편 제조용 PCR 조건은 다음과 같다.

• CD3(ORF1, ORF4), CD6(ORF1, ORF2)

Pre-denaturation:	94°C	3min	
Denaturation	: 94°C	1min	} 30cycle
Annealing	: 52°C	2min	
Extension	: 72°C	2min 30'	

• CD3(ORF2, ORF3), CD4(ORF2, ORF3)

Pre-denaturation:	94°C	3min	
Denaturation	: 94°C	1min	} 30cycle
Annealing	: 52°C	2min	
Extension	: 72°C	2min	

● CD4(ORF1)

Pre-denaturation	: 94°C	3min		
Denaturation	: 94°C	1min	}	30cycle
Annealing	: 52°C	2min		
Extension	: 72°C	3min		

③ subcloned된 유자정유성분 대사능을 지닌 형질전환주 선별

형질전환주의 선별은 ampicillin(50 μ g/mL)을 가한 M9 고체최소배지(noble agar, 15g; NaHPO₄ 6g; KH₂PO₄ 3g; NaCl 5g; NH₄Cl, 1g per liter; pH7.0)에 형질전환주를 도말한 후 100 μ l의 limonene을 기체상태로 공급하면서 28°C에서 평판 배양하였다.

④ Subcloning 된 균주의 생육

subcloning된 4종의 형질전환주를 limonene과 0.005% yeast extract를 첨가한 M9 최소배지에서 배양하였다.

⑤ 상동성분석

유전자의 염기배열을 NCBI의 BLAST 및 ExASY program을 이용하여 상동성 검사를 실시하였다.

3) 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화

① 유자정유의 생전환

구축된 고발현 시스템 하에서의 어떠한 영양물의 보충 없이 유자정유를 유

일한 탄소원으로 하는 M₉ 최소배지에서 유자정유의 생전환을 6, 12, 24, 48 시간 시행하였다. 생전환 시간에 따른 생전환 화합물의 분석을 GC-MS와 GC-O를 통하여 분석하였다.

② GC-MS(성분 분석)

- 미생물이 생산한 성분의 종류와 양을 GC-MS를 통하여 분석하였다. 물질의 분석은 GC-MS의 결과에 따른 mass spectrum과 표준물질의 authentic RI와 비교하여 최종 화합물로 결정하였다. GC-MS의 operation 조건은 다음과 같다.

[Column]	DB-Wax fused silica 0.32mm × 60mm(J & W Sci. Co.)
[Injector]	250℃
[Detector]	250℃
[Column temp. program]	40 - 220℃ 2℃/min up to 150℃ 4℃/min up to 220℃ with a 3min initial hold time
[Injection]	1μℓ

4) 폐유자박으로부터 정유 추출

① 유자박의 전처리

본 연구에 사용된 유자박은 2002년도 완도에서 생산된 유자를 농가로부터 직접 구입하였다. 유자는 구입직후 수세하여 선별한 후 유자를 압착기(실험실에서 자체제작)를 이용하여 압착하여 유자 착즙액을 분리한 다음, 유자박은 -20℃에 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

② 증류에 의한 추출

정유성분을 추출은 최적 추출조건에서 실험하였다. 실험조건은 유자박과 증류수를 1:2로 섞은 다음, 수증기 증류에 의한 방법으로 증기 압력은 2.5kgf/cm²(128℃), 증류시간은 30분으로 하였다.

5) 미생물학적 조향 기법에 의한 Bioessential 오일의 생산

본 연구에서 사용한 균주 및 plasmid는 Table 1-4와 같다.

Table 1-4. The bacterial strains, and plasmids used in this experiment.

Strain	Description
strains	
* <i>E. agglomerans</i> 6L	유자정유 대사능, limonene 대사능
** <i>E. coli</i> ECC3	<i>E. coli</i> BL21 w/ pETC3
<i>E. coli</i> ECC4	<i>E. coli</i> BL21 w/ pETC4
<i>E. coli</i> ECC6	<i>E. coli</i> BL21 w/ pETC6
plasmid	
pETC3	pET29b(+) + CD3(유자정유 대사능 유전자 8.6kb)
pETC4	pET29b(+) + CD4(유자정유 대사능 유전자 4.6kb)
pETC6	pET29b(+) + CD6(유자정유 대사능 유전자 7.7kb)

* *E. agglomerans* 6L은 유자정유나 limonene을 대사 할 수 있는 미생물로 기존의 보고된 limonene이나 terpene화합물을 대사 하는 미생물보다 훨씬 우수한 균주:

① 유자정유가 유일한 탄소원 배지에서 cell growth \approx 4.0(for 120h)

② limonene 독성 저항성이 기존의 보고보다 30배이상

** *E. coli* ECC series는 유자정유 대사능 유전자의 고발현 시스템으로 1차년도 연구 결과물임

① 배양방법

- 유자정유 대사능을 지닌 모균주 *E. agglomerans* 6L은 limonene을 탄소원으로 하는 M9최소배지(Na₂HPO₄ 6g/L, KH₂PO₄ 3g/L, NaCl 0.5g/L, NH₄Cl 1g/L, 1M MgSO₄, 0.1M CaCl₂, pH 7.0)에서 48시간동안 28℃에서 전배양

한 후 유자정유가 유일한 탄소원인 M9최소배지에 1%접종하여 120h동안 28℃에서 배양하여 사용하였다.

- *E. coli* ECC3, ECC4, ECC6은 LB(bactopeptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L, Agar 15g/L, kanamycin 50μg/mL)plate에 도말하여 28℃에서 배양시켰다. 유자정유가 유일한 탄소원인 M9최소배지(with kanamycin 50μg/mL)에 activation 된 colony를 0.005 O.D(A600)까지 접종하였고 배양 후 15분에 0.01mM IPTG를 사용하여 induction시켰다.
- 대조구는 균을 접종하지 않은 M9 50mL 최소배지에 유자정유만 공급한 후 각각의 시간별로 위의 실험구와 동일한 조건에서 실험구와 동일한 조건하에서 진탕배양 하였다.

② 모균주 및 유전자 재조합체들의 공동배양에 의한 조향

모균주와 고발현균주인 *E. coli* ECC3, ECC4, ECC6를 유자정유가 유일한 탄소원으로 하는 M9 최소배지에서 유자정유의 생전환을(*E. agglomerans* 6L;120h, ECC3 & ECC4;12h, ECC6;24h, ECC3+ECC4+ECC6;48h)시행하였다. 모균주와 각각의ECC3, ECC4, ECC6의 배양 후 배양액을 적정비율로 혼합하여 4℃에서 하룻밤 방치 후 배양 상정액을 얻는 방법으로 미생물 조향을 시행하였다.

③ 생전환 된 물질추출(용매추출)

배양이 종료된 미생물 배양액을 4℃에서 원심분리(12,800×g, 20min)하여 상정액을 얻었다. Internal standard인 ethyl maltol을 1,000ppm가한 후 상정액은 pH 2.0로 조정한 후 Millipore 0.45μm filter로 상정액을 완전히 제균 하

였다. 이 상징액은 ether(3×0.5vol.)를 사용하여 추출한 후 질소가스 기류 하에서 추출 분획을 농축하였다. 이 추출액은 다시 무수 Na₂SO₄로 충전된 극성column을 사용하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 추출액은 휘발성 향기성분이므로 온도가 낮은 질소가스 기류 하에서 천천히 essential oil상태로 농축하였다. GC-MS분석 전에 모든 시료는 Olfactory test를 통하여 추출물의 전체적인 향에 대한 관능검사를 시행하였다.

④ GC-MS(성분 분석)

미생물 배양액으로부터 얻어진 추출액의 대사산물 분석을 위하여 본 학과 보유 Shimadzu GC-MS QP-5000(Japan)을 사용하였다. 대사산물의 분석은 ethyl maltol을 내부표준물질(internal standard)로 사용하여 정량 하였다. 물질의 분석은 GC-MS의 결과에 따른 mass spectrum과 표준물질의 authentic RI와 비교하여 최종 화합물로 결정하였다. GC-MS의 operation 조건은 다음과 같다.

[Column]	DB-Wax fused silica 0.32mm × 60mm(J & W Sci. Co.)
[Carrier gas]	Helium (1.0 ml/min)
[Injector]	250℃
[Detector]	230℃
[Column temp. program]	40 - 220℃ 2℃/min up to 150℃ 4℃/min up to 220℃ with a 3min initial hold time
[Temperature]	ion source and interface 230℃
[Ionization]	electron impact ionization (EI)
[Ionization voltage]	70 eV
[Mass range (m/z)]	41 ~ 450
[Injection]	1μl

6) Bioessential oil의 추출수율 증대 공정 확립

① 추출기 제작

Steam distillator, 3단응축장치, 감압장치 등을 사용하여 약 52℃ steam하에서 감압가열에 의한 Bioessential oil 추출용 추출기를 제작하였다.

② 추출기를 통한 향기물질 분리

본 연구팀이 이미 확보하고 있는 강력한 유자정유 생전환능 미생물 *E. agglomerans*6L(120h)과 고발현균주인 ECC6(24h)를 유자정유가 유일한 탄소원인 M9 최소 배지에서 배양한 후 얻어진 각각의 배양액을 4℃에서 원심분리(12,800×g, 20min) 하여 상정액을 얻었다. Millipore 0.45 μ m filter로 상정액을 완전히 제균 하였고 각각의 상정액 750mL를 혼합한 1.5L의 시료를 사용하였다. 시료의 온도가 50℃로 됐을 때 water pump를 이용하여 추출기 전체의 압력을 낮췄다. 응축기는 1차, 2차, 3차로 나뉘었으며, 3차 응축기로 ethanol이 들어가서 1차 응축기로 나오는 system을 이용하였다. 응축 온도는 -3℃ ~ -10℃사이에서 조정하였고 추출기는 총2시간 동안 작동하였다.

7) Bioessential oil의 생산

① 폐유자박으로부터 유자정유 생산(증류에 의한 추출)

유자박 1kg과 증류수 2L를 5L jar에 섞은 다음, 수증기 증류에 의한 방법으로 보일러(제우에너지, korea)에서 나오는 스팀으로 끓인다. 증기 압력은 2.5kgf/cm², 증류시간은 끓기 시작하여 15~20분으로 하였다.

② 균주배양

유자정유대사능을 지닌 모균주 *E. agglomerans* 6L은 유자정유를 유일한 탄소원으로 하는 M₉최소배지에서 48시간 전배양 한 후 1%를 접종하여 120시간 동안 28℃에서 배양하였다.

③ 생전환 물질추출(용매추출)

배양이 종료된 미생물 배양액을 원심분리(12,800×g, 20min, 4℃)하여 상정액을 얻었다. pH2.0으로 상정액을 조정 한 후 Millipore 0.45µm filter로 완전히 제균 하였다. 이 상정액은 ether(3×0.5vol)를 사용하여 추출한 후 질소가스 기류 하에서 추출 분획을 농축하였다. 이 추출액은 다시 무수 Na₂SO₄로 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 추출액은 휘발성 향기성분이므로 온도가 낮은 질소가스 기류 하에서 천천히 essential oil 상태로 농축하였다.

8) 시제품제작

① 쿠키 만들기

a. 재료

재료	박력분	버터	쇼트닝	설탕	분설탕	소금	계란	탈지분유	oil	색소
무게(g)	800	280	160	280	120	8	320	24	5ml(2ml oil/ 3ml MCT) Orange oil(IFF), Bioconversion oil(6L)	황색 제4호 (오정상사, 영국)

b. 제조방법

유지, 설탕, 소금, 쇼트닝 넣고 크림화 시킨다. → 계란 2개씩 넣고 섞는다.
→ 향을 내는 오일을 넣고 섞는다. → 체로 친 박력분과 탈지분유를 조금 넣고 1,2의 반죽의 층 분리를 막는다. → 밀가루 다 넣고 나무주걱으로 가

운대를 가르며 살살 섞는다.(너무 세면 딱딱해진다.) → 별 모양 각지가 달린 찰주머니 에 끼우고 반죽을 채운 후 일정 모양으로 찐다. → 높이 1cm 미만, 반죽과 반죽의 상·하, 좌·우 간격은 2.5cm가 되도록 한다. → 오븐에서 160℃, 10분 동안 굽는다.

c. 관능Test

쿠키를 만든 직후부터 조선대학교 대학원생 15~19명을 대상으로 3차례에 걸쳐 관능평가를 하였다.

② 마들렌 제조

a. 재료

재료	박력분	버터	꿀	설탕	아몬드 분말	베이킹 파우더	계란	술	oil
무게 (g)	170	200	25	250	100	5	5개	15	6.25ml(2.5ml oil/ 3.75ml MCT) Herb oil(IFF), Bioconversion oil(6L)

b. 제조방법

버터를 녹인다. → 설탕, 달걀, 꿀 저어준다. → 밀가루와 2번을 섞어준다. 40℃ 럼주(negrita럼주) 15CC → 향을 섞는다. → 렘을 섞은 후 냉장에서 3시간 숙성한다. → 틀에 버터(유지)를 바른다. 1개당 0.5g 말라지도록 → 굽기 150-180℃, 18-19분

c. 관능Test

마들렌을 만든 직후부터 조선대학교 대학원생 15~19명을 대상으로 2차례에 걸쳐 관능평가를 하였다.

9) 독성실험

Bioconversion oil의 안전성 평가를 위하여 일반독성 시험 중 급성 독성시험, 아급성 독성시험을 식품의약품안전청 국립독성연구소 독성·약리·병리 시험 표준지침서에 준하여 행하였다.

① 급성 독성시험(Acute Toxicity Test)

: 복강투여에 의한 평균치사량 (LD₅₀mg/kg)측정

마우스에 음성대조물질(negative control) 내열성이 강한 유화제인 MCT (medium chain triglyceride)를 사용하였다. 시험물질은 bioconversion oil로 휘발을 방지하기 위하여 MCT에 혼합하여 3가지 농도로 시험하였으며, 양성대조물질(positive control)로 는 orange oil 과 limonene을 MCT에 혼합한 후 사용하였다.

② 아급성 독성시험

마우스에 음성대조물질(negative control ; basal diet), 시험물질(cookie contained bioconversion oil 16.6mg/kg), 양성대조물질(positive control ; cookie contained orange oil 16.6mg/kg)을 분말사료에 혼합하였다. 성인 body weight 1kg당 16.6mg의 bioconversion oil이 함유되도록 한 결과 20g mouse는 1일 0.33mg의 bioconversion oil이 필요하며 쿠키는 한 마리당 0.32g이 요구된다. 0.32g쿠키를 분말사료에 혼합하여 마우스에 30일간 급여 후 관찰하였다.

3. 고발현 시스템 구축

기보유

<p>- 유용 미생물(모균주): <i>E. agglomerans</i> 6L</p> <p>특징 ① limonene과 유자정유성분(limonene 외에도 다수의 terpene화합물들의 혼합물을 대사할 수 있는 미생물</p> <p>② 기존의 보고된 limonene이나 terpene화합물 대사 미생물 보다 훨씬 높은 대사능: limonene 독성에 대한 저항성이 기존의 보고에서 보다 30배 이상 ↑</p> <p>③ 유자 정유가 유일한 탄소원인 배지에서 cell growth: $A_{600} \approx 4.0$ (for 120h)</p> <p>- 유용 유전자(형질전환주) 유자정유 대사능 유전자 클로닝</p> <p>특징 ① 유자정유 대사능 유전자: (CD3: 8.6kb, CD4: 4.6kb, CD6: 7.7kb)를 지닌 형질전환주 (vector pUC18 in <i>E. coli</i> TG1): EC3, EC4, EC6</p> <p>② 유자정유가 유일한 탄소원인 M₉ 배지에서 cell growth A_{600}: 0.085 - 0.132 (for 12-24h)</p>

① 고발현용 host vector system

고발현용 vector pET29b(+)에서 유자정유대사능 유전자(CD3, CD4, CD6)를 삽입하여 pETC3, pETC4, pETC6(Fig. 1-1)를 재조합하여 *E. coli* BL21에 형질전환 시켜 고발현용 형질전환주 ECC3, ECC4, ECC6를 획득하였다.

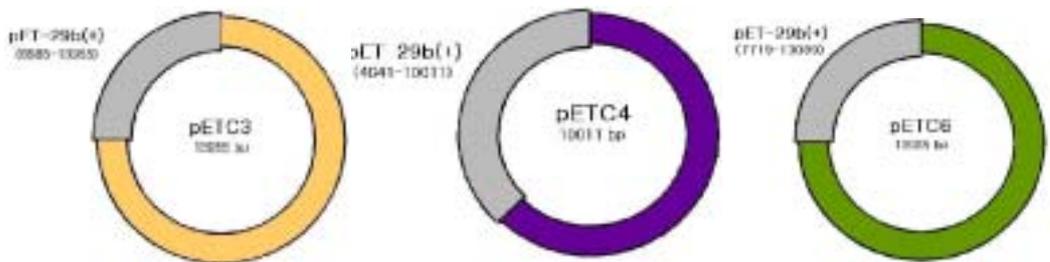


Figure 1-1. Reconstruction of citron oil degrading genes in pET29b(+) vector

② 고발현 시스템에서의 균 생육(Fig. 1-2)

- 고발현용 3종의 형질 전환주를 limonene을 유일한 탄소원으로 하는 M₉최소 배지에서 생육하였을 때 약 배양 3시간 이후 정지기에 도달하였으며 일반 vector system인 pUC18 vector($A_{600} \approx 0.1$)에서 보다, 고발현 vector인 pET system($A_{600} \approx 0.4$)에서 균 생육은 3~4배 더 증가하였다.
- 유자정유를 유일한 탄소원으로 하는 최소배지에서는 일반 vector system에서는 limonene에서와 별 차이 없이 $A_{600} \approx 0.1$ 정도의 생육도를 나타내었으나, 고발현vector system에서 성장 시 A_{600} : 0.4~0.8 정도의 생육도를 나타내었고, pET system의 *lacUV5* promoter에 의한 IPTG induction을 시도하였을 때 A_{600} : 0.6~1.0에 이르는 높은 생육도의 증가를 나타내었다(약 10배 ↑).
- 유자정유와 같은 terpenoid 화합물은 대부분의 미생물에 대해 강력한 독성 작용이 있으므로 유자정유의 생전환에 의한 고부가가치 향기물질 생산을 위해서는, 어떠한 영양물의 추가공급 없이도 유자정유내의 terpenoid 화합물만을 잘 대사할 수 있는 강력한 미생물의 대사시스템과 보다 많은 cell mass가 요구되어진다. 본 연구결과에서는 유일한 탄소원으로 limonene이나 유자정유를 공급한 최소배지에서 유자정유 대사능을 지닌 형질전환주에 의하여 높은 균 생육을 얻을 수 있는 시스템을 구축하였다.
- Limonene(97% Sigma-Aldrich co.)은 시판용을 사용하였고, 유자정유는 폐자원인 폐유자박을 자체 제작한 steam distillation 장치를 사용하여 steam distillation에 의하여 생산하였다. 이때 steam distillation 조건은 30분 동안 $2\text{kg}/\text{cm}^2(115^\circ\text{C})$ 에서 수행하였다.

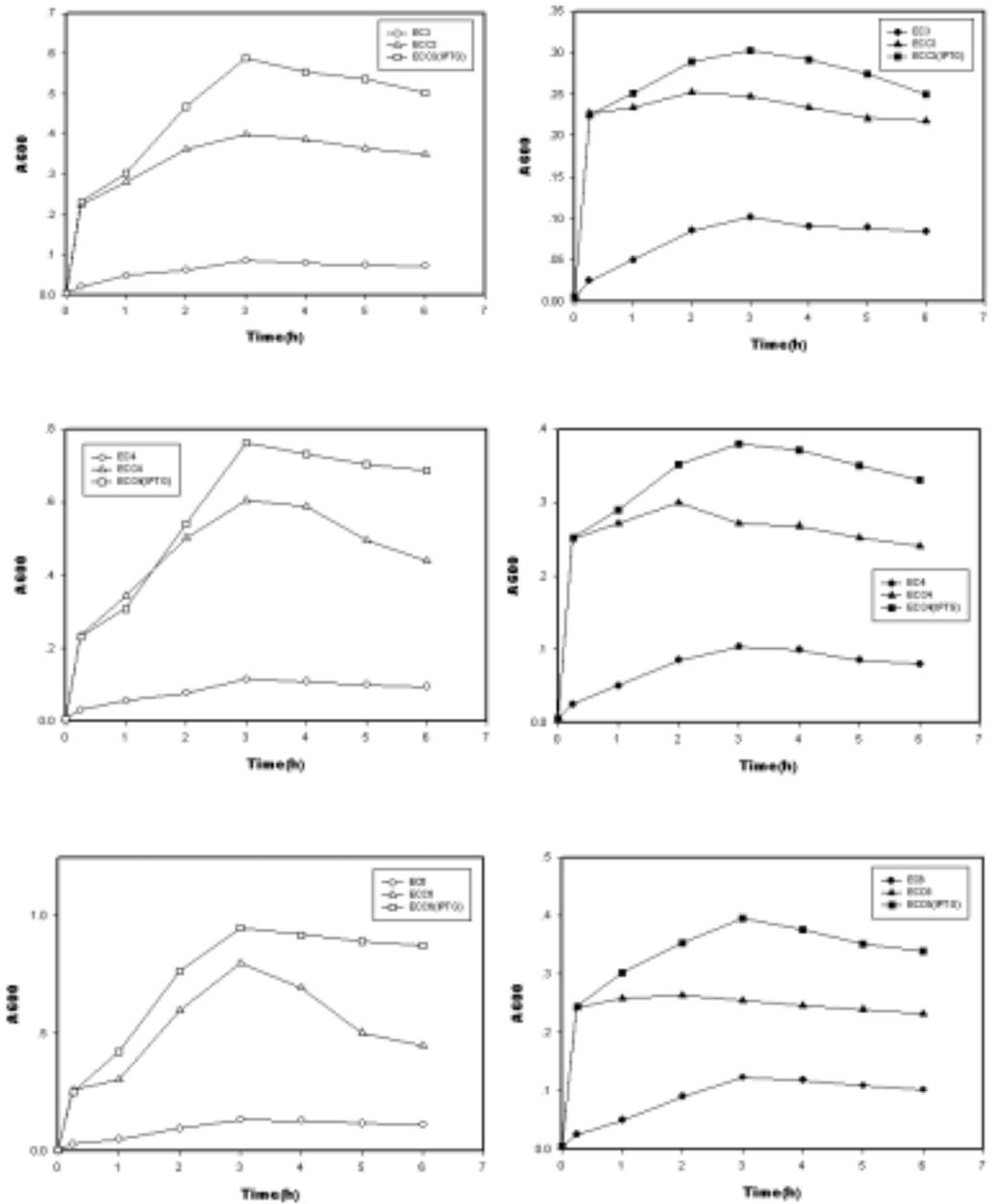


Figure 1-2. Growth of three transformants using a pET system in M_9 minimal media with limonene or citron oil as sole carbon source at 28°C.

left lane: citron oil media, right lane: limonene media

4. 유자정유 성분 대사능 유전자의 염기서열 결정 및 구조유전자의 subcloning

① 유자정유 대사능 유전자(CD3, CD4, CD6)의 DNA 염기서열 결정 및 상동성 분석

- 강력한 유자정유 대사능을 지닌 미생물(모균주 혹은 형질전환주)은 본 연구에서처럼 부가가치가 상대적으로 더 높은 다른 terpene 화합물로 전환시키거나, 더 나아가 난분해성 화합물인 terpene 화합물을 포함한 어떠한 소재를 분해하는데 적용시킬 수 있다.
- 이때 보다 정확한 물질대사와 생전환 반응의 조건 확립 및 조절을 위해서는 유자 정유 대사능 미생물의 유전자가 어떻게 구성되어 있으며, 기존의 밝혀진 유전자와는 어떠한 상관관계가 있는지 규명함이 선행되어야 한다. 즉 정확한 유전자의 구성 및 특성이 규명된다면 이 유전자를 어느 영역까지 적용하여 활용할 수 있으며 어떻게 조절할 수 있는지, 또한 불필요한 유전자를 제거한 꼭 필요한 유전자만으로 구성된 새로운 재조합 유전체를 구성할 수 있다. 그리하여 이로부터 목적하는 용도에 따라 최적의 유전체를 지닌 형질전환주를 얻을 수 있을 것이며, 이 새로운 형질전환주를 사용하면 생전환반응 조절이 보다 더 용이하여 질 것이다.
- 위와 같은 목적에 따라 모균주 *E. agglomerans* 6L로부터 클로닝된 3개의 유전자 CD3, CD4, CD6의 염기서열을 결정하였다(Fig.1-3). 유자정유 대사능 유전자 CD3는 8,586bp크기이며 이 안에 4개의 open reading frame이 존재하였다. 이 4개의 ORF와 기존의 Database의 다른 유전자들과의 아미노

산 상동성 분석결과 ORF①~③는 nitrate transport component 와 유전자의 일정부분이 70-80%에 이르는 상동성을 나타내었고 ORF④는 nitrate regulatory protein과 유전자의 일정부분이 35%의 아미노산 상동성을 나타내었다.

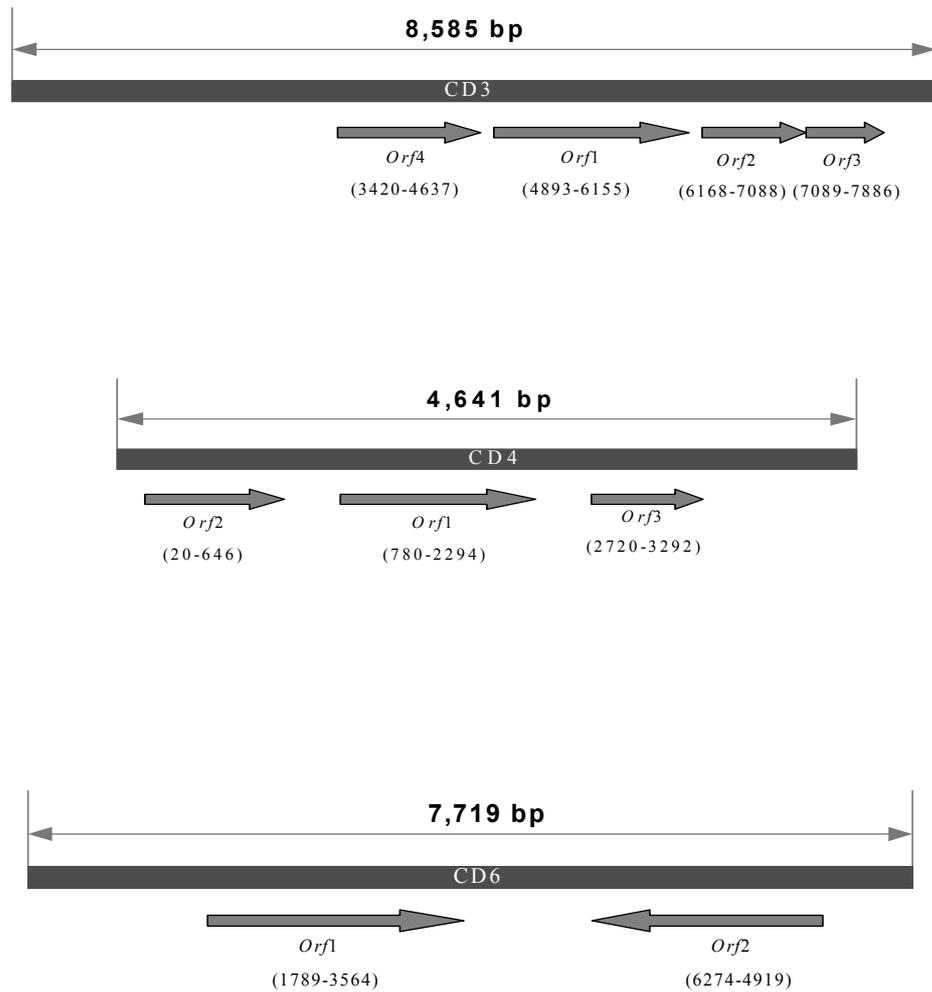


Figure 1-3. Genomic organization of citron degrading genes(CD3, CD4, CD6) from *E. agglomerans* 6L.

- CD4는 4,641bp크기이며 이안에 3개의 ORF가 존재하였다. ORF①(1,515bp)은 ATP-binding component of high affinity L-arabinose transport system과 88%의 상동성을 나타내었고, ORF②(627bp)는 L-arabinose binding periplasmic protein과 89%의 상동성을, ORF③(573bp)는 ABC-type arabinose transport system permease component와 95%의 높은 상동성을 나타내었다.
- CD6는 7,719bp크기이며 이안에 2개의 ORF가 존재하였다. ORF①(1,776bp)과 ORF②(1,356bp)는 여러 미생물 유래의 hypothetical proteins와 33%, 88%의 상동성을 각각 나타내었다.
- 이상의 결과를 정리하면 CD3와 CD4는 electron transfer에 관계하는 유전자임을 추정할 수 있고 CD4가 arabinose 대사에 관계하는 gene cluster와 매우 높은 상동성을 나타낸 것은 매우 흥미 있는 결과이다. 유자정유 대사능 유전자가 유자정유의 약 70%를 차지하는 limonene을 비롯한 각종 terpenoid 화합물을 산화시킴으로써 고부가가치 Bioessential oil이 생성된다는 점을 고려하면, 유전자의 domain별 분석에 의한 기능성(electron transfer function) 추적이 적절히 이루어졌음을 알 수 있다.
- 기존에 terpenoid 화합물을 대사 할 수 있는 유전자의 염기 서열에 대한 보고는 미국 미시간 대학의 Dr. Oriol 팀의 *B. stearothermophilus* BR388로부터의 limonene hydroxylase gene이 유일한 보고이다. 이 연구는 본 연구책임자가 1993년 클로닝한 유전자로서 2000년 그 염기서열이 결정되었으며, 이 유전자가 코드하는 아미노산의 상동성 분석 결과 기존의 유전자와는 상동성이 없다고 보고하였었다. Terpene 화합물 대사능 유전자에 관한 유일한

보고인 limonene hydroxylase gene의 염기서열과 본 연구팀의 유자정유 대사능 유전자의 각각의 ORF별 아미노산 상동성을 살펴보면 25~47%에 이르는 높은 상동성을 나타내었고 특히 CD3, CD4, CD6의 주요한 ORF는 모두 약 45%정도의 높은 상동성을 나타내었다(Table 1-5).

- 본 연구에서의 유전자 염기서열 결과는 terpene화합물 대사능 유전자에 관한 보다 다양한 정보를 제공하는 세계최초의 중요한 결과이다(cf. Dr. Oriel의 유전자는 limonene만을 대사하고 다른 terpene화합물은 대사하지 못함). 다만 클로닝 된 3개의 유자정유 대사능 유전자를 구성하는 각각의 ORF가 전체 유자정유 대사계에 어떠한 영향을 미치는지 조사하여야 할 것이며, 이로부터 이 ORF를 적절히 재조합 시 보다 강력한 유자정유 대사능 유전체의 합성이 가능함을 시사하고 있다.

② Subcloning : PCR에 의한 각 ORF 단편을 지닌 형질전환주 선별

- 형질전환주의 선별은 ampicillin(50 μ g/mL)을 가한 M₉ 고체최소배지(noble agar, 15g; Na₂HPO₄, 6g; KH₂PO₄, 3g; NaCl, 5g; NH₄Cl, 1g per liter; pH7.0)에 형질전환주를 도말한 후 100 μ l의 limonene을 기체상태로 공급하면서 28 $^{\circ}$ C에서 평판 배양하였다.
- 약 5일 배양 후 CD3-ORF2(920bp), CD4-ORF1(1,515bp), CD6-ORF1(1,776bp), CD6-ORF2(1,356bp)의 단편을 지닌 형질전환주 만이 동배지에서 작은 집락을 형성하였다. 집락을 형성한 형질전환주는 putative limonene hydroxylase gene으로써, 두 차례 더 M₉고체 최소배지에서 limonene을 유일한 탄소원으로 하는 연속해서 배지에서 배양 시 집락을 재현하여 형성하는 것을 최종 확인 하였다.

③ Subcloning 된 균주의 생육

- Subcloning된 4종의 limonene hydroxylase gene을 함유한 형질전환주를 limonene과 0.005% yeast extract를 첨가한 M₉ 최소액체배지에서 배양하며 생육을 관찰하였다.

- 액체배지의 조성은 다음의 3종류로 준비하였다.

① M₉ mineral medium + limonene(유일한 탄소원)

② M₉ mineral medium + 0.005% yeast extract(탄소, 질소원)

③ M₉ mineral medium + limonene + 0.005% yeast extract

4종의 형질전환균주 모두 ①배지에서는 거의 생육이 관찰되지 않았으며

②배지에서는 A600에서 약 0.01정도의 생육을 보였으나, M₉ 최소배지에 limonene과 생육보강제로 0.005% yeast extract를 가한 배지에서는 A600에서 약 0.03정도의 생육을 나타내어 이 4종의 유전자(ORF)가 모두 limonene degrading gene-hydroxylase function을 지님을 확인 할 수 있었다.

④ Subclone된 ORF의 상동성분석

- Subcloning된 균주의 생육실험에 의하여 CD3의 4개 ORF중 ORF2가 CD4의 3개 ORF 중 ORF1이 CD6의 2개 ORF 중에서는 이 두개의 ORF모두 limonene degrading structural gene(putative limonene hydroxylase gene)임을 확인하였다.

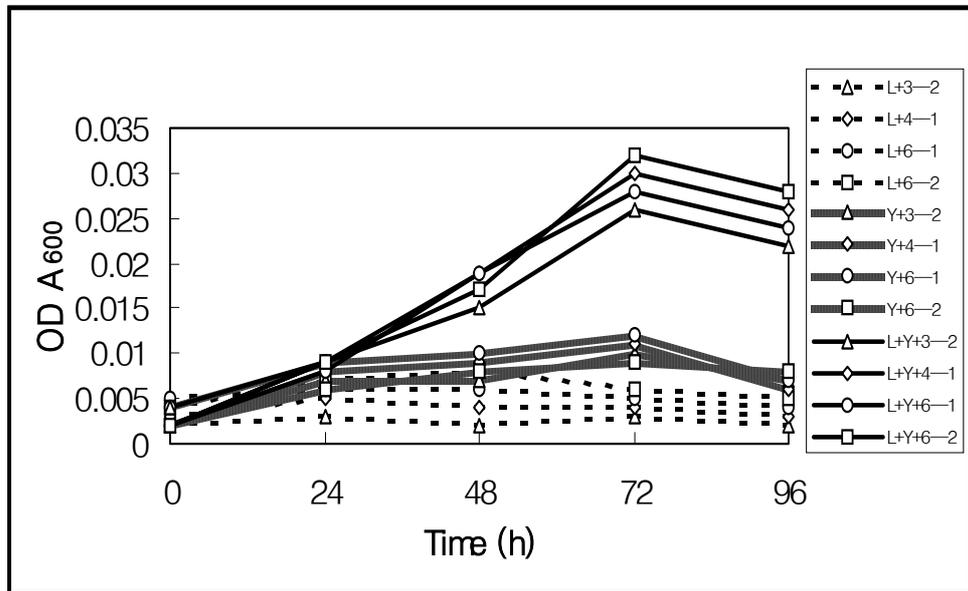


Figure 1-4. Growth of 4 transformants in M9 minimal media with limonene as sole carbon source at 28°C

L : limonene as sole carbon source

Y : 0.005% yeast extract

3-2 : *E. coli* TG1 transformant harboring ORF 3-2 DNA fragment

4-1 : *E. coli* TG1 transformant harboring ORF 4-1 DNA fragment

6-1 : *E. coli* TG1 transformant harboring ORF 6-1 DNA fragment

6-2 : *E. coli* TG1 transformant harboring ORF 6-2 DNA fragment

- 기존에 세균으로부터 limonene을 대사 할 수 있는 유전자로서 클로닝 되어 그 염기서열이 규정된 유일한 보고인 Oriole 등이 보고한 *B. stearothermophilus*로부터의 limonene hydroxylase gene과 본 실험에서 subcloning된 4개의 유전자와의 상관관계를 NCBI의 BLAST 및 ExPASy program을 이용하여 조사하였다. Oriole 등의 limonene hydroxylase gene과 CD3-ORF2는 약34%, CD4-ORF1와는 약 46%, CD6-ORF1과는 약 47%, ORF2와는 약 45%의 상동성을 나타내었다. CD3-ORF2가 이들 유전자간의 상동성이 가장 낮게 나타났으며 나머지 유전자들은 *B. stearothermophilus*

의 limonene hydroxylase 유전자와 약 50%에 이르는 상동성을 나타내었다.

- 본 연구에서 분리된 4종의 ORF간의 상동성을 살펴보면 CD3-ORF2, CD4-ORF1, CD6-ORF1간에는 약 37~40%의 상동성을 보이나 CD6-ORF2는 나머지 3개의 유전자와 44-46%에 이르는 보다 높은 상동성을 나타내는 것으로 분석되었다.

Table 1-5. Amino acid identity between limonene hydroxylase gene from *B. Stearotherophilus* BR388 and citron degrading genes from *E. agglomerans* 6L.

gene	homology(%)	source
Limonene hydroxylase	100	Oriel <i>et al.</i> (2000)
CD3 - ORF1	43.1	this work
ORF2	35.8	"
ORF3	33.3	"
ORF4	42.9	"
CD4 - ORF1	45.7	"
ORF2	28.2	"
ORF3	25.8	"
CD6 - ORF1	46.9	"
ORF2	44.8	"

5. 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화

: 유자정유 대사능 유전자의 고발현 시스템에서의 발현

① 대사산물 분석 : 최적 생전환 조건 및 대사산물

- 고발현 시스템에서 유자정유의 생전환을 시행하였다. 고발현 시스템 하에서의 ECC3, ECC4, ECC6를 M₉최소 액체배지에서 유일한 탄소원으로 유자정유를 기체상태로 지속적으로 공급하면서 28℃에서 진탕 배양하여 생전환을 시도하였다. 배양시간에 따른 생전환 최적조건을 구하기 위하여 12, 24, 48, 72시간동안 배양한 배양액을 시료로 사용하였다.
- 3종의 유자정유 대사능 유전자(CD3, CD4, CD6)를 지닌 고발현 시스템에서 생전환시 3종의 균주 모두 주요대사산물로는 linalool, 4-terpineol, α -terpineol을 공통적으로 생산하였다(Table 1-6). 그러나 minor 산물의 양과 종류는 균종에 따라 다르게 나타났으며(Table 1-7), 3종의 미생물에 의한 중요한 향의 차이는 이 minor 물질에 의하여 결정되어 지는 것으로 여겨졌다(Table 1-8). 즉 CD3를 지닌 ECC3에서는 꽃향과 달콤한 향이, CD4를 지닌 ECC4는 citrus한 상큼한 향이, CD6를 지닌 ECC6에서는 부드러운 꽃향과 달콤한 향이 주향으로 나타났다. ECC3와 ECC4는 12시간대에 ECC6는 12시간~24시간대에서 가장 강하게 향을 느낄 수 있었다. 이러한 결과는 배양시간에 따라 생산된 생전환 물질의 양을 분석한 결과, 배양 12시간~24시간 사이에 가장 많은 향기물질이 생산되며 그 이후 차차 감소되는 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

Table 1-6. Identification of major bioconversion products formed from citron oil by high expression host-vector systems.

Cultivation Time (h)	Component	Peak Area		
		ECC3	ECC4	ECC6
12	linalool	435,938,507	1,286,489,623	384,978,255
	4-terpineol	31,522,785	110,642,374	25,139,859
	α -terpineol	39,709,066	161,296,299	31,806,376
24	linalool	88,652,688	542,403,090	487,267,185
	4-terpineol	8,483,310	37,066,658	33,742,434
	α -terpineol	15,199,542	50,898,591	47,012,573
48	linalool	64,086,320	127,076,976	71,531,526
	4-terpineol	3,823,934	7,799,830	3,895,748
	α -terpineol	4,923,596	9,052,239	4,857,765
72	linalool	159,960,889	138,671,697	147,735,949
	4-terpineol	10,353,188	9,763,649	7,648,315
	α -terpineol	13,125,197	13,318,998	9,884,153

Table 1-7. Identification of minor bioconversion products formed from citron oil by high level expression host-vector systems.

Cultivation Time (h)	Component		
	ECC3	ECC4	ECC6
12	dodecanol, veridiflorol, spathulenol	dodecanol, citronellyl acetate, β -terpinyl acetate, nerol, nerolidol, veridiflorol, spathulenol, elemol, carvone, z-citral	4-dodecanol, veridiflorol, spathulenol, β -terpineol
24	-	octadecane, veridiflorol, spathulenol	cyclohexanone, 4-ethyl, veridiflorol, spathulenol

Table 1-8. Aroma description of citron oil bioconversion products by high level expression host-vector systems.

Cultivation Time (h)	Aroma description		
	ECC3	ECC4	ECC6
12	꽃향, 약간달콤	citrus한 상큼	연한귤냄새 →mild한 꽃향
24	은은한꽃 → 텅텅한 냄새	상큼한 꽃 →텅텅한 냄새	부드러운 sweety
48	시원함+연한꽃냄새	유자+텅텅	mild한 꽃
72	citrus+파스	mild한 꽃	파스냄새

* 가장 강하게 느낄 수 있는 향

6. 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의 생산

① 미생물조향을 위한 미생물의 배양(Table 1-9)

- 모균주인 *E. agglomerans* 6L과 이로부터 분리된 유자정유 대사능 유전자를 지닌 고발현용 형질전환주인 ECC3, ECC4, ECC6를 유자정유가 유일한 탄소원인 M9 최소배지에서 단독 또는 공동배양 하여 미생물학적 조향을 시도하였다. 이들 균주가 지닌 유자정유 생전환 대사계를 사용하여 유자정유로부터 각기 다른 향기물질을 생산하고 다시 이들의 조합에 의해 또 다른 Bioessential oil을 생산 하고자 하였다.
- 이때 유자정유대사계가 서로 다른 미생물들(모균주 혹은 형질전환주)의 배양시간의 설정이 무엇보다 중요하다. 미생물 조향을 위한 각각의 미생물의 최적배양 시간의 설정은 각각의 미생물들을 유자정유를 유일한 탄소원으로 하는 M9최소배지에서 모균주의 경우 96h, 120h 형질전환주의 경우 6h, 12h, 24h, 48h 배양하였다. 이때 배양액 배합 비율을 1:1, 2:1, 3:1로 하였다. 대사산물은 용매로 추출한 후 그 추출액의 전체적인 향기를 유자정유와 그 대

사산물의 향기에 반복 훈련된 5인의 검사자가 후각검사를(sniffing test) 통하여 최적의 배양시간과 배합비율을 결정하였다.

- 모균주는 120h, ECC3과 ECC4는 12h, ECC6는 24h 배양한 것을 최적 배양시간으로 설정하였다. ECC3+ECC4+ECC6구는 48h 배양한 것이 가장 기호도가 높아 48h을 최적 배양시간으로 설정하였다.
- 미생물학적 조향 비율은 모두 1:1 비율이 가장 기호도가 높아서 이후의 미생물학적 조합 실험의 배양액 혼합비율은 1:1로 설정하여 시행하였다.
- 미생물학적 조향을 위한 미생물의 최적 배양시간 및 이때의 균의 생육도는 Table 1-9에 정리하였다. 미생물학적 조향은 모균주와 형질전환주의 혼합구와 3개의 형질전환주를 혼합하는 구로 모두 4구로 나누어 시행하였다. 모균주와 형질전환주 혼합구의 경우는 각각의 배양액을 배양 후 적정 O.D에 도달하면 혼합하여 일정시간 방치 후(4℃, O/N) 용매로 추출하여 GC-MS로 분석하였다. 3개의 형질전환주만을 혼합한 경우는 배양초기부터 3개의 형질전환주를 동시에 접종하여 48시간 배양 후 그 대사산물을 추출·분석하였다.

Table 1-9. Cell growth and optimum bioconversion time by using the microbial conversion systems.

배양형태	미생물	균 생육도(A_{600})	생전환에 의한 대사산물 최적생산 시간(h)
단 독 배 양	모균주 <i>E. agglomerans</i> 6L	≈4.0	120
	고발현시스템 형질전환주 ECC3, ECC4, ECC6	0.8~1.0	12~24
미 생 물 학 적 조 향	6L+ECC3	6L: 3.3(120 h) ECC3: 0.482(12 h)	120+12
	6L+ECC4	6L: 3.3(120 h) ECC3: 0.655(12 h)	120+12
	6L+ECC6	6L: 3.3(120 h) ECC3: 0.792(24 h)	120+24
	ECC3+ECC4+ ECC6	0.620	48

② 향기물질의 조성물 분석

- 모균주 *E. agglomerans* 6L과 ECC3의 조향 시료에서는 달콤한 향이 낮으며 GC-MS를 통한 향기물질 분석결과 carvone이 가장 많은 양(전체 생전환 화합물의 약 59%)으로 검출되었으며 그 외 trans-linalool oxide, o-cymene, β -cyclocitral, cis-linalool oxide, 2-octen-4-ol, carvone, thymol 이 검출되었다(Table 1-10).
- 모균주 *E. agglomerans* 6L과 ECC4의 조향 시료에서는 상큼한 향이 낮으며 GC-MS를 통한 향기물질 분석결과 carvone이 가장 많은 양(전체 생전

환 화합물의 약 76%)으로 검출되었으며 그 외 trans-linalool oxide, carvone, hydroxy linalool, tetradecanol, hexadecanal, thymol이 검출되었다 (Table 1-11).

- 모균주 *E. agglomerans* 6L과 ECC6의 조향 시료에서는 꽃향이 낮으며 이 역시 carvone이 가장 많은 양(전체 생전환 화합물의 약 68%)으로 검출되었고 외에 trans-linalool oxide, 1-4 cineol, octanal, o-cymene, tridecane, hexanol, dodecanal, verbenone, carvone이 검출되었다(Table 1-12).
- ECC3, ECC4, ECC6를 혼합배양하는 시료에서는 전자의 3종의 시료 보다는 기호도가 훨씬 떨어지고 향도 상대적으로 약하게 나타났다. 이 시료에서는 fresh한 향이 낮으나 소독약과 같은 냄새가 깔려 있었다. 주성분은 o-cymene이었고 이외 cyclohexanone, hexen-1-ol, nonanal, isoborneol, piperitone이 검출되었다(Table 1-13).

Table 1-10. Identification of microbial conversion products formed from citron oil by microbial flavor designing(6L 120h + ECC3 12h).

component	RT	RI	peak area	relative peak area(%)
trans-linalool oxide	40.588	1483	72,039,669	27.32
o-cymene	26.089	1264	192,859,920	73.13
β-cyclocitral	46.832	1578	14,384,092	5.45
cis-linalool oxide	38.715	1454	105,562,498	40.03
2-octen-4-ol	40.111	1475	43,023,398	16.31
carvone	56.946	1746	826,702,564	313.49
thymol	74.650	2201	132,001,666	50.06

Table 1-11. Identification of microbial conversion products formed from citron oil by microbial flavor designing(6L 120h + ECC4 12h).

component	RT	RI	peak area	relative peak area(%)
trans-linalool oxide	40.536	1482	59,805,597	22.68
carvone	56.915	1746	761,347,331	288.71
hydroxy linalool	70.706	2065	17,700,657	6.71
tetradecanol	72.955	2137	85,243,823	32.32
hexadecanal	73.539	2160	60,058,817	22.77
thymol	74.598	2200	13,747,785	5.21

Table 1-12. Identification of microbial conversion products formed from citron oil by microbial flavor designing(6L 120h + ECC6 24h).

component	RT	RI	peak area	relative peak area(%)
trans-linalool oxide	38.705	1453	86,571,297	34.78
1-4 cineol	20.321	1177	3,454,171	1.39
octanal	28.460	1300	900,851	0.36
o-cymene	26.030	1263	152,105,580	61.10
tridecane	27.811	1290	4,248,599	1.71
hexanol	32.807	1364	6,971,751	2.80
dodecanal	50.864	1643	27,969,312	11.24
verbenone	55.306	1718	11,639,182	4.68
carvone	56.893	1745	622,170,735	249.94

Table 1-13. Identification of microbial conversion products formed from citron oil by microbial flavor designing(48h ECC3 + ECC4 + ECC6).

component	RT	RI	peak area	relative peak area(%)
o-cymene	25.797	1260	27,207,471	6.39
cyclohexanone	28.048	1293	6,199,534	1.46
hexen-1-ol	34.844	1394	6,912,472	1.62
nonanal	35.252	1400	2,876,410	0.68
isoborneol	54.945	1711	8,064,648	1.90
piperitone	56.328	1736	1,387,662	0.40

relative peak area(%) = [peak area of component]/[peak area of ethyl maltol(internal standard)]×100

- 미생물조향에 의한 각 시료별 주요 산물과 그 산물들의 향과 이들이 혼합된 그 전체 시료에서 나는 향을 Table 1-14에 정리하였다. 6L+ECC3, 6L+ECC4, 6L+ECC6 모두 매우 기호도가 높은 향이었으며, 조향을 하지 않고 모균주인 6L이나 3종의 형질전환주를 각각 사용하여 유자정유를 생전환시켰을 때와는 전혀 다른 향으로 평가되었다. 즉 일정 미생물자원 pool을 사용하여 다양한 향기물질의 생산이 가능하고 특정 정유성분(예: 비조향시: linalool, 4-terpineol; 미생물 조향 시: carvone)을 선택적으로 생산할 수 있음을 보여주어 그 산업적 활용가능성이 크다.

Table 1-14. Identification of major conversion products from citron oil by microbial flavor designing.

Sample	Component	Aroma description	Overall aroma
6L + ECC3	trans-linalool oxide o-cymene β-cyclocitral cis-linalool oxide 2-octen-4-ol carvone thymol	minty, fruity green powerful sweet-woody, floral-woody-earthy warm-herbaceous, spicy, slightly floral woody, burnt smoky	달콤한 향
6L + ECC4	trans-linalool oxide carvone hydroxy linalool tetradecanol hexadecanal thymol	warm-herbaceous, spicy, slightly floral woody, burnt smoky	상큼한 솔향
6L + ECC6	trans-linalool oxide o-cymene dodecanal verbenone carvone	floral, sweet, waxy herbaceous spicy, minty, camphoraceous warm-herbaceous, spicy, slightly floral	꽃향
ECC3+ECC4 +ECC6	o-cymene		fresh향

7. 추출기에 의한 Bioessential oil의 추출

① 추출기 제작 및 최적 추출조건 확립

- 실험실적으로 분석을 위한 시료의 경우는 용매추출법이 가장 용이하지만, 실제 산업적 생산 체제에서 Bioessential oil의 용매추출법은 ㉠ 한번에 처리할 수 있는 배양액 양의 한계(용매추출 경우 분획깔데기에 용매와 배양액을 섞어주므로 1회 혼합액이 100mL 이하), ㉡ 폐유기용매의 처리 ㉢ 많은 추출시간의 소요 등의 문제가 있어 적절하지 못하다. 그러므로 본 연구에서는 실험실 scale이지만 한번에 처리하는 미생물 배양액 양을 1.5L 정도로 하여 추출기에 의한 Bioessential oil의 추출이 가능한지 또한 추출 후 향기물질은 용매추출의 경우와 어떠한 차이가 있는지 비교 분석하였다.
- 유자정유 생전환 미생물배양액을 감압 하에서 steam distillator로 열을 가하여 최소의 가열에 의하여 휘발성 향기물질을 포집하였다. 응축기는 감압 장치로 빠지는 향기 물질을 최소화하기 위하여 3단으로 설계하고 1, 2, 3단 응축기로 갈수록 응축수의 온도를 낮추었다. 3단 응축기의 온도를 증기발생 초기에는 -3°C 에서 증기량이 포화에 달하는 가열 후 40분경에는 -10°C 로 조정하였다. 응축수는 ethyl alcohol을 사용하였다(Fig. 1-5).



Figure 1-5. The designed extractor for the Bioessential oil extraction.

② 추출기를 사용한 미생물 조향 물질의 분석

- 미생물 조향구중 가장 기호도가 높다고 평가된 *E. agglomerans* 6L과 *E. coli* ECC6의 혼합 시료를 선택하여 제작된 추출기의 활용가능성을 살펴보았다. 1.5L의 유자정유 생진환 미생물 배양액을 제작된 추출기에서 추출하여 약 20mL의 hydrosol을 얻었으며 이를 ether용매추출 하여 약 50 μ L의 Bioessential oil을 얻었으며 이를 GC-MS로 분석하였다.
- 6L과 ECC6의 미생물학적 조향 시료를 추출기를 사용하여 향기물질을 추출한 후 GC-MS로 분석하였을 때 주 화합물로 2-nonenal, trans-linalool oxide이 검출되었고 총 8개 물질이 동정되었다(Table 1-15). 추출된 Bioessential oil에서는 달콤한 냄새와 시원한 꽃 냄새가 혼합된 냄새가 났다.

Table 1-15. Identification of microbial conversion products from citron oil by the steam distillator.

component	RT	RI	peak area	relative peak area(%)
α-phellandrene	21.249	1192	225,532,109	90.60
trans-linalool oxide	38.6	1452	1,070,902,833	430.20
2-ethyl hexanol	41.738	1501	169,820,024	68.22
linalool	45.343	1556	354,408,406	142.37
2-nonenal	46.141	1568	1,178,463,638	473.41
camphor	46.409	1572	200,165,152	80.41
4-terpineol	48.796	1409	315,936,313	126.92
α-amorphene	55.742	1725	396,288,035	159.20

E. agglomerans 6L and *E.coli* ECC6 strain were cultivation in M9 media with citron oil as the sole carbone source.

6L was cultivated for 120h at 28°C, ECC6 was cultivation for 24h at 30°C.

The cultures were mixed together and stored for O/N at 4°C, then the microbial cultures were extracted with ether(ref. experimented method)

- 6L+ECC6의 미생물학적 조향 시료를 추출기와 용매추출에 의해 추출된 Bioessential oil의 flavor components를 비교하면 Table 16와 같다. 동일한 시료를 추출기와 용매추출을 사용하였을 때 공통적으로 trans-linalool oxide가 검출되었고 이외에는 서로 다른 물질이 검출되었다(Table 1-16). 추출방법에 따라 추출 과정 중 손실되어 버리거나 화합물간의 반응 등의 이유로 서로 다른 물질이 검출됨을 확인하였다.

- 용매추출과 추출기에 의한 추출을 비교하여 보면 ㉠, ㉡와 같다.

㉠ 용매추출: Bioessential oil의 추출량 1μl Bioessential oil/mL배양액,
소요시간 6min/mL 배양액

㉞ 추출기 추출: Bioessential oil추출량 0.04 μ l/mL 배양액, 소요시간 4.8sec/mL 배양액

즉 추출량은 용매추출에 비하여 25배 낮고 소요시간은 75배 빠르다. 추출기 사용 시 추출량이 용매추출에 비하여 떨어짐은 본 추출시스템은 소규모 미생물배양액을(1.5L) 증류시켰고 이때 생성된 증류 응축된 적은 양의 Bioessential oil은 수기에 포집되기도 하지만 응축기의 내부 표면에 부착되어 있어 이로부터 생기는 포집되는 Bioessential oil의 손실에서 기인하는 것으로 여겨진다. 실제 산업화 현장에서는 보다 많은 양의 배양액을(ton단위) steamdistillation 시키면서 compact하지만 효과적인 냉각 응축장치를 사용한다면 추출효율을 증대시킬 수 있을 것이다.

Table 1-16. The produced flavor components by the steam distillator vs. solvent extraction.

추출기에서만 나온 물질	공통으로 나온 물질	용매추출에서만 나온 물질
2-ethyl hexanol linalool 2-nonenal camphor 4-terpineol α -phellandrene α -amorphene	trans-linalool oxide	1-4 cineol octanal o-cymene tridecane hexanol dodecanal verbenone carvone

* Bold characters indicate major conversion components which were identified from citron oil conversion media.

8. 시제품제작

① 쿠키(Fig. 1-6)

- 유자정유 대사능을 지닌 모균주 *E. agglomerans* 6L은 유자정유를 유일한 탄소원으로 하는 M₉최소배지에서 배양한 후 배양액을 추출하여 bioessential oil(bioconversion oil)을 얻었고, 이것을 이용하여 쿠키를 제조하였다.
- Bioconversion 쿠키에 사용한 오일은 꽃향과 허브향이 낮으며, 반죽의 입자가 Orange oil 보다 고왔고, 쿠키가 완성된 후에는 오렌지 오일보다 조금 더 바삭한 느낌 이었다. 향은 화한 느낌으로 입안을 상쾌하게 하였으며 쿠키의 느끼한 맛을 덜어주었다. Orange oil쿠키는 IFF사에서 판매하는 oil을 사용하였고, 향은 기존의 과자, 음료 등에서 많이 접해본 전형적인 Orange 향이 낮다.
- 쿠키 제조 시 제과·제빵용 essential oil로 시판되고 있는 orange oil과 본 연구에서의 bioconversion essential oil을 첨가하여 관능검사 분석 결과 (Table 1-17)와 Excel에 의한 이분산 가정 test에 의한 통계처리 결과는 Table 1-18과 같다.
- 본 실험에 의하여 제과·제빵에 가장 널리 사용되는 시판용 orange oil과 본 연구에서의 Bioessential oil간에는 9점 만점 관능의 평균점수는 orange oil 첨가군이 6.39±1.49점 Bioessential oil 첨가군이 6.06±1.09점으로 orange oil군이 다소 높으나 유의수준 0.05에서 검정 P=0.1997>0.05(유의수준)범위에서 그 평균값이 다르다고 할 수 없다. 즉 orange oil 첨가군과 Bioessential oil 첨가군의 기호도가 같은 수준임을 알 수 있었다.



Figure 1-6. The cookies, which were made with bioconversion oil in this experiment. Common used essential oil for making cooky, orange oil was used as control.

Table 1-17. 쿠키에 대한 관능검사 분석

피검자	Orange					Bioconversion				
	1차	2차	3차	총합	평균	1차	2차	3차	총합	평균
이름										
박연진	4	6	8	18	6	6	7	7	20	6.667
이경미	4	4	3	11	3.667	7	7	7	21	7
위세라	8	8	4	20	6.667	6	5	3	14	4.667
이혜영	5	5		10	5	6	7		13	6.5
이유미	7	4	8	19	6.333	4	6	3	13	4.333
이정화	6	8	8	22	7.333	5	6	6	17	5.667
하진옥	8	8	8	24	8	7	7	6	20	6.667
김은정	8	7		15	7.5	6	5		11	5.5
손지용	8	6		14	7	6	4		10	5
김민정	7	1		8	4	5	6		11	5.5
양혜련	7			7	2.333	5			5	5
양은주	6	8	9	23	7.667	6	7	7	20	6.667
김효주	7	7	7	21	7	6	6	6	18	6
장미	7	8	8	23	7.667	4	8	7	19	6.333
조유란	8	6	7	21	7	5	5	7	17	5.667
장지윤	8	7	7	22	7.333	6	8	8	22	7.333
이울	7	4		11	5.5	6	5		11	5.5
노한승	6			6	6	4			4	4
최현숙	8.5			8.5	8.5	8			8	8
김영광	8	7		15	7.5	7	6		13	6.5
장해춘	6			6	6	7			7	7
이명렬	6			6	6	8			8	8
추명희	7			7	7	6			6	6

O : Orange oil (시판용-제과·제빵)

B : Bioessential oil by microbial conversion

Table 1-18. t-검정: 이분산 가정 두 집단

	Orange	Bioconversion
평균	6.39130435	6.065217
분산	2.22880984	1.143281
관측수	23	23
가설 평균차	0	
자유도	40	
t 통계량	0.8516237	
P(T<=t) 단측 검정	0.19974648	
t 기각치 단측 검정	1.68385101	
P(T<=t) 양측 검정	0.39949296	
t 기각치 양측 검정	2.02107537	

HO : O와 B는 같다. (귀무가설)

HI : O와 B는 다르다. (대립가설)

② 마들렌(Fig. 1-7)

- Bioconversion oil의 향은 쿠키보다 마들렌에 더 어울리며, 마들렌의 좋지 않은 향을 잡아주며, 특유의 화한 향이 뒷맛을 깨끗하게 해준다. Bioconversion oil의 화한 herb향과 비교하기 위해 IFF사의 Herb oil을 사용하여 마들렌을 만들었는데 과자의 씨즈닝 향과 느끼한 향 때문에 기호도가 아주 낮았다.
- 마들렌 제조 시 제과·제빵용 essential oil로 시판되고 있는 herb oil과 본 연구에서의 bioconversion essential oil을 첨가하여 관능검사 분석 결과 (Table 1-19)와 Excel에 의한 이분산 가정 test에 의한 통계처리 결과는 Table 1-20과 같다.
- 본 실험에 의하여 Bioessential oil 첨가군과 제과·제빵에 널리 사용되며 본 연구에서 제조된 Bioessential oil과 향의 느낌이 유사한 Herb oil을 첨가한 군과의 관능검사 결과는 9점 만점에서 Bioessential oil첨가군은 5.95 ± 1.57 점, Herb oil 첨가군은 2.77 ± 1.26 점으로 나타났다. 이 결과는 유의수준 0.05에서 검정 $P=2.469-09 < 0.05$ (유의수준)범위에서 다르다고 할 수 있으며 Bioessential oil첨가 마들렌이 Herb oil 첨가군 보다 기호도가 유의수준 0.05에서 높다고 할 수 있다.

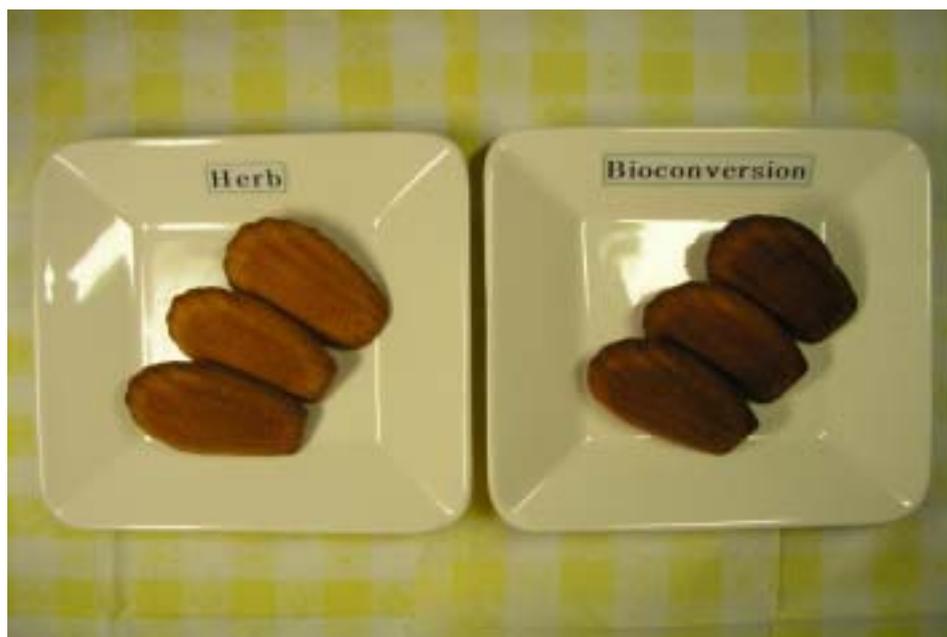


Figure 1-7. The madeleine, which were made with bioconversion oil in this experiment. Common used essential oil for making madeleine, herb oil was used as control.

Table 1-19. 마들렌에 대한 관능검사 분석

이름	Bioconversion				Herb			
	1차	2차	총합	평균	1차	2차	총합	평균
하진옥	6	7	13	6.5	3	5	8	4
이유미	4	2	6	3	2	3	5	2.5
이정화	5	4	9	4.5	4	2	6	3
장미	7	7	14	7	1	2	3	1.5
장지윤	7	6	13	6.5	0	0	0	0
김효주	6	6	12	6	2	2	4	2
조유란	8	7	15	7.5	3	4	7	3.5
이경미	7	5	12	6	3	2	5	2.5
양은주	6	4	10	5	4	2	6	3
박연진	8	7	15	7.5	2	3	5	2.5
김은정	7	7	14	7	2	4	6	3
김민정	7	6	13	6.5	5	3	8	4
손지용	7	7	14	7	0	4	4	2
이울	6	8	14	7	3	4	7	3.5
이혜영	7		7	7	2		2	2
양혜련		6	6	6		4	4	4
이혜영		3	3	3		2	2	2
위세라		2	2	2		4	4	4
김영광	7		7	7	6		6	6
위세라	7		7	7	1		1	1
최현숙	5		5	5	3		3	3
노한승	7		7	7	2		2	2

H : Herb oil (시판용-제과·제빵용)

B : Bioessential oil by microbial conversion

Table 1-20. t-검정: 이분산 가정 두 집단

	Bioconversion	Herb
평균	5.9545455	2.772727
분산	2.4502165	1.588745
관측수	22	22
가설 평균차	0	
자유도	40	
t 통계량	7.4259474	
P(T<=t) 단측 검정	2.409E-09	
t 기각치 단측 검정	1.683851	
P(T<=t) 양측 검정	4.819E-09	
t 기각치 양측 검정	2.0210754	

HO : O와 B는 같다. (귀무가설)
 H1 : O와 B는 다르다. (대립가설)

9. 독성실험

Bioconversion oil의 안전성 평가를 위하여 일반독성 시험 중 급성 독성시험, 아급성 독성시험을 식품의약품안전청 국립독성연구소 독성·약리·병리 시험 표준지침서에 준하여 행하였다.

1) 급성독성시험(Acute Toxicity Test) : 복강투여에 의한 평균치사량 (LD₅₀mg/kg) 측정

① 사망

- 본 실험에 사용된 sample의 농도를 Table 1-21에 정리하였다.

Table 1-21. Composition of sample in this experiment.

Species	Groups	Composition	Injection volume	
Mouse	A	MCT	200 μ l MCT only	200 μ l
	B	2,000mg/kg	bioconversion oil 50 μ l +150 μ l MCT	200 μ l
		1,500mg/kg	bioconversion oil 36 μ l +164 μ l MCT	200 μ l
		1,000mg/kg	bioconversion oil 24 μ l +176 μ l MCT	200 μ l
	C	O 2,000mg/kg	orange oil 50 μ l +150 μ lMCT	200 μ l
		L 2,000mg/kg	limonene 50 μ l +150 μ lMCT	200 μ l

- 마우스에 음성대조물질로(negative control) 내열성이 강한 유화제인 MCT (medium chain triglyceride)를 사용하였다. 시험물질은 bioconversion oil로 휘발을 방지하기 위하여 MCT에 혼합하여 3가지 농도로 시험하였으며, 양성대조물질(positive control)로 는 orange oil 과 limonene을 MCT에 혼합

한 후 사용하였다. 1일 1회 7일간 복강 투여한 결과, 시험기간 내 대조군과 bioconversion oil 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다(Table 1-22).

② 독성

- Bioconversion oil 2,000mg/kg 투여군의 경우 전 실험동물에서 활동성 감소(activity decreased), 털의 황변(yellow color of hair), 연변(soft stool)이나 설사(diarrhea)와 유사한 상태의 배설물 배설, 눈의 돌출, 입 주위의 청색증(cyanosis), 코의 배출물(nasal discharge) 및 체중 증가율 둔화 등 임상증상이 나타났으나 4일 경과 후 회복되었고 체중도 증가하였으며 기타 시험물질에 기인한 중독증상은 관찰되지 않았다.
- Bioconversion oil 1,500mg/kg 에서는 8시간 후 까지 이상 증상이 없었으며 1일째부터 2일까지 설사 증상이 있었으나 2일이 지난 후에는 회복되었다. 1,000 mg/kg 투여 에서는 별다른 증상이 관찰되지 않았다. 대조군에서는 별다른 이상증상이 관찰되지 않았다(Table 1-23).
- 투여 초기에 관찰된 사료 섭취량 감소현상은 시험물질혼입에 의한 기피현상으로 판단되었고, 이러한 현상은 투여 3일째 소실되어 정상으로 회복되었으며, bioconversion oil 2,000mg/kg에서 4일째 체중 증가량이 타군에 비하여 가장 적었는데, 이는 bioconversion oil의 과량 투여로 인한 일시적 사료 섭취량 감소에 기인한 것으로 사료된다. 이러한 현상은 곧 회복되었으며 그 이후에도 대조군과 bioconversion oil 급여군 사이에 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 1-26).
- Bioconversion oil을 1일 1회 7일간 복강투여 하였을 때 최고용량(2,000

mg/kg)에서도 시험동물은 계속 생존하여 치사량을(LD₅₀)나타내지 않았다. 따라서 bioconversion oil 은 2,000mg/kg의 용량까지 특이할 만한 독성작용을 나타내지 않았으며, LD₅₀치가 2,000mg/kg 이상인 저독성 물질로 판단되었다(Table 1-22).

Table 1-22. Mortality and LD₅₀ values of mice administered samples for 7 days.

Species	Groups	Dose (mg/kg)(I.P) ⁴⁾	Days after treatment					Final Mortality	LD ₅₀ (mg/kg)
			0	1	3	5	7		
Mouse	A ¹⁾	-	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
	B ²⁾	2,000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	>2,000
		1,500	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	>1,500
		1,000	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	>1,000
	C ³⁾	O (2,000)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	>2,000
		L (2,000)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	>2,000

^{1), 2), 3)} : See the legend of Table 1-21.

⁴⁾ I. P. : intraperitoneal injection

Table 1-23. Clinical signs in mice administered samples for 7 days.

Species	Groups ¹⁾	Dose (mg/kg) (I.P)	Clinical signs							
			activity decreased	yellow color of hair	softstool	diarrhea	eye protraction	cyanosis	nasal discharge	bodyweight decreased
Mouse	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	2,000	++	++	+	+++	+	+	+	+
		1,500	-	-	-	+	-	-	-	-
		1,000	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	O (2,000)	-	+	-	-	-	-	-	-
		L (2,000)	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ See the legend of Table 1-21.

²⁾ -; no signs, +; mild, ++; moderate, +++; severe

2) 아급성 독성시험

① 사망률

- 마우스에 음성대조물질(negative control ; basal diet), 시험물질(cookie contained bioconversion oil 16.6mg/kg), 양성대조물질(positive control ; cookie contained orange oil 16.6mg/kg)을 분말사료에 혼합하였다. 성인 body weight 1kg당 16.6mg의 bioconversion oil이 함유되도록 한 결과 20g mouse는 1일 0.33mg의 bioconversion oil이 필요하며 쿠키는 한 마리당 0.32g이 요구된다. 0.32g쿠키를 분말사료에 혼합하여 마우스에 30일간 급여 후 관찰한 결과 시험 기간 내 대조군과 bioconversion oil 급여군에서 사망례는 관찰되지 않았다(Table 1-24).
- Bioconversion oil의 30일간 급여에서 10마리 중 2마리의 항문 주위에 2일간 연변(soft stool)이 관찰되었는데 bioconversion oil의 급성독성시험에서 관찰된 설사와 마찬가지로 bioconversion oil이 위장관내의 물을 흡수하여 유발된 것으로 판단되며, 정도가 심하지 않고 2일 후 회복되었다. 그 외 별다른 임상증상은 관찰되지 않았고 부검결과 장기의 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.

Table 1-24. Mortality of rats administered samples for 30 days.^{a,b)}

Groups	Dose (mg/kg)	(days)						end	Mortality
		0	7	14	21	28	30		
Norm ¹⁾	-	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S. ^{c)}	0/10
Biocon ²⁾	16.6mg/kg	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S.	0/10
Orange ³⁾	16.6mg/kg	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	T.S.	0/10

¹⁾ Norm : negative control(basal diet only)

²⁾ Biocon : basal diet mixed with bioconversion oil

³⁾ Orange : basal diet mixed with orange oil

^{a)} Mice were administered orally samples for 30 days,

^{b)} Values are expressed as the numbers of dead animals/ total numbers of animals,

^{c)} T.S. : terminal sacrifice.

② 체중증가율

- 투여 1주일의 체중증가율에서, 음성대조군에 비하여 bioconversion oil 급여군은 둔화됐으나 유의적인 현상은 아니었으며, 양성대조군은 유의적으로 둔화되었다. 이러한 현상은 실험동물의 시험물질 혼입에 대한 기피현상으로 인하여 나타난 결과로 판단되며, 이러한 현상은 2주째부터 소실되어 음성대조군의 체중증가율 수준으로 회복되었다(Fig. 1-25).

Table 1-25. The growth rate of mice administered samples for 30 days.

Groups ¹⁾	Growth rate ²⁾			
	1	2	3	4
Norm	1.14±0.02	1.16±0.01	1.27±0.01	1.35±0.01
Biocon	1.09±0.01 ^{2)a,b)}	1.14±0.01	1.26±0.01	1.31±0.01
Orange	1.07±0.02 ^{b)}	1.17±0.01	1.28±0.01	1.32±0.01

¹⁾ See the legend of table 1-24.

²⁾ Growth rate (W1/W0) :Ratio of the body weight (W1) to initial body weight(W0), Values are mean ±S.E.of 10 rats per each group

³⁾ Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T) test.

③ 식이섭취율

- 대조군과 bioconversion oil 급여군 간에 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

Table 1-26. Feed efficiency ratio of mice administered samples for 30 days.

Groups ¹⁾	Weeks			
	FER ²⁾			
	1	2	3	4
Norm	0.69±0.12	1.35±0.12	2.22±0.12	2.93±0.11
Biocon	0.81±0.16	1.20±0.15	2.50±0.10	2.85±0.11
Orange	0.60±0.14	1.52±0.13	2.32±0.16	2.77±0.16

¹⁾ See the legend of table 1-24.

²⁾ Feed efficiency ratio(FER) : The total amount of weight increased/ the total intake of food. Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group.

④ 간장/체중 비율

- 투여 30일 후 측정된 간장/체중 비율은 bioconversion oil 급여군이 대조군에 비하여 유의하게 상승되었는데, 이는 bioconversion oil 급여군의 간장중량이 증가되어 나타난 결과로 판단되나 본 실험의 경과만으로는 단정지을 수 없고 앞으로 간장 중 지방함량 측정 등 다양한 실험이 요구된다 (Table 1-27).

Table 1-27. The liver weight and body weight of mice administered samples at 30 day.

Groups ¹⁾	liver weight(g)	body weight(g)	liver weight/ body weight
Norm	2.07	39.44	1.53±0.01 ^{a)}
Biocon	2.37	41.11	1.80±0.01 ^{b)}
Orange	2.14	40.97	1.64±0.01 ^{a)}

¹⁾ See the legend of table 1-24.

²⁾ Values are mean± S.E. of 10 rats per each group.

³⁾ Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T) test.

⑤ 혈청 중 효소활성 검사

- 혈청 중 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase) 및 ALP(alkaline phosphatase)의 활성에서, 대조군과 Bioconversion oil 투여군 간에 효소활성이 모두 생리적 정상 범위 내의 변화였으므로 Bioconversion oil에 기인한 독성증상은 나타나지 않는 것으로 판단되었다.
- Aminotranferase(ALT, AST)는 조직의 손상정도를 나타내는 대표적 염증 수치 효소로, 비 특이적이며 활성의 증가는 세포장해정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐만 아니라 다른 혈중 유출 효소보다 더욱 예민하게 반응한다. 따라서 간염, 지방간, 간경변증 및 간암 등으로 인하여 세포에 독성이 생기면 간세포가 파괴되고 세포내에 있던 효소들이 혈중으로 유출되어 혈청 효소활성이 증가하게 된다. 세포내 활성도는 혈청 내 활성도보다 크다. ALP도 역시 신체 각 조직 중에 존재하는 효소로 간염, 간경변증 등의 진단 및 예후를 관찰하는데 이용되는데 주로 담즙배설 장애와 담관내압항진에 의하여 간에서 생성이 증가되어 혈중으로 유출된다. 본 실험에서 대조군과 bioconversion oil 급여군 간에 AST, ALT 및 ALP 활성의 변화가 정상범위였는데, 이 결과에서 bioconversion oil 16.6mg/kg는 간세포 손상 등 중독증상을 유발하지 않고 안전하게 사용할 수 있는 사용량으로 추정되었다(Table 1-28).

Table 1-28. Activities of AST, ALT and ALP in serum of mice administered samples for 30 days.

Groups ¹⁾	Karmen u/mL		
	AST	ALT	ALP
Norm	41.75±0.92	33.17±1.84	40.76±1.93
Biocon	42.25±1.59	33.28±1.39	41.63±0.76
Orange	41.75±0.92	34.60±1.49	41.20±1.87

¹⁾ See the legend of table 1-24.

²⁾ Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group.

- 이상의 아급성 독성실험에서, 본 실험에서 정정한 bioconversion oil 16.6 mg/kg을 30일간 급여하여 일반증상, 효소활성검사 및 장기의 육안적 관찰 모두에서 bioconversion oil과 관련된 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으므로, bioconversion oil을 1개월간 급여 시 무영향량은 16.6mg/kg 이상일 것으로 추정된다.

● **본 연구결과 및 의의를 정리하면 다음과 같다.**

- 유자정유의 추출 방법에 따라 약간 그 조성량이 달라지나 일반적으로 유자정유의 70~90%는 limonene이 차지한다고 알려지고 있다. Limonene의 현재 단가는 72\$/kg이며, 본 연구에서는 유자정유를 폐자원인 폐유자박으로부터 steam distillation에 의하여 생산하였다. 본 연구에 추출된 유자정유의 경우 조성화합물 중 주요 성분인 limonene은 55.3%, linalool은 5.9%, α -terpineol은 0.8%, 4-terpineol은 0.56%의 함량 %를 나타내었다.
- 이러한 조성의 유자정유를 미생물 대사시스템에 의해 생전환 시켰을 때, 전체 생전환 산물의 20~50%를 차지하는 물질은 linalool이었다. 이 linalool의 단가는 198\$/kg이며 3~6%를 차지하는 α -terpineol과 4-terpineol의 단가는 약 500\$/1L이다. 이외에 minor성분으로 검출되는 nerol은 1,820\$/1L, nerolidol은 1,270\$/1kg등 원료기질로 공급되는 유자정유내의 limonene에 비해 모두 고부가가치 화합물이며, 이러한 화합물의 최적생산 시기는 12~24 시간대 인 것으로 나타났다. 최종결과를 모균주, 형질전환주, 고발현 형질전환주로 나누어 비교하면 Table 1-29와 같다.

Table 1-29. Cell growth and optimum bioconversion time by using the microbial conversion systems.

미생물	균 생육도(A_{600})	생전환에 의한 대사산물 최적생산 시간(hr)
모균주 <i>E. agglomerans</i> 6L	≈4.0	120
형질전환주 EC3, EC4, EC6	0.085~0.132	24
고발현시스템 형질전환주 ECC3, ECC4, ECC6	0.8~1.0	12~24

- 본 연구결과에 의해 구축된 고발현 시스템에 의해 보다 높은 균생육과 짧은 시간 내에 생전환 된 product를 회수할 수 있는 미생물 대사시스템을 확보하였다. 이러한 공정의 단축화는 실제 산업화 시 매우 중요한 결과로 경제성이 높아짐을 의미한다. 그러나 본 연구결과를 기술이전을 통한 산업화를 위해서는 단순히 생전환에 의하여 물질이 몇 배 증가하였다는 결과제시 보다는, 보다 정량적인 생산 물질의 검증이 필요하다. 그러므로 생전환 물질의 GC-MS분석 시 internal standard를 사용하여 생전환 물질들을 보다 정확히 정량적 생산량 증감을 제시하고자 위탁과제의 연구를 통하여 가장 적절한 internal standard(ethyl mantol, nonane)를 결정하였다.

- 본 연구에서는 폐유자박으로부터 유자정유를 분리하여 이를 자원화 함과 동시에 분리된 유자정유를 미생물의 생전환 시스템을 사용하여 보다 더 부가가치가 높은 향기물질로 전환시키고자 하였다. 이렇게 생전환 된 물질은 식품, 의약품, 향장품등에 활용이 가능한 물질이어야 하고 유자정유나 생전환 된 향기물질들 모두 terpene류의 화합물로서 향 미생물작용이 강하므로 강력한 유자정유 대사능을 지닌 미생물의 선발이 요구된다.

- 강력한 유자정유 대사능을 지닌 미생물 *E. agglomerans* 6L과 그 형질전환주를 사용하여 이를 미생물학적 향 생산 산업에 적용시키기 위하여, 유자정유 대사능 고발현 시스템을 구축하였고 이 고발현 시스템과 모균주의 미생물학적 조향을 통하여 고부가가치 향기물질 생산을 시도하였다. 즉 유자정유의 70-90%를 차지하는 정유성분의 현재 단가는 72\$/kg이며 1차년도에 이를 고발현 미생물 대사시스템에 의해 생전환시켰을 때 주 화합물은 linalool(198\$/kg), α -terpineol(약 500\$/kg), 4-terpineol(약 500\$/kg)이 검출되었다.
- 미생물학적 조합에 의해 유자정유를 생전환시켰을 때 주 화합물(대사산물의 50% 이상 차지) carvone이었으며 단가는 1,472\$/kg로 상대적으로 보다 더 높은 부가가치를 지니는 화합물이다. 이들 화합물은 모두 식·의약품에서 사용 가능한 물질이다.
- 이와 같이 미생물학적 방법에 의해 생산된 향기물질은 식물체에서 향기물질을 추출하는 방법일 경우 식물체 내의 많은 협잡물이 존재함에 비하여, M9 최소배지에 유자정유만을 탄소원으로 넣었기 때문에 다른 협잡물이 거의 없는 경우이므로 추출·정제가 월등히 용이하다는 장점이 있다.
- 본 연구에서 실험실 scale로 제안된 추출기와 같은 보다 다양하고 최적화된 추출기를 사용한다면 보다 경제적이고 용이하게 정유성분의 추출정제가 가능하여 미생물학적 향기 생산이 산업적으로 가능함을 시사한다. 미생물학적 방법에 의한 향기 물질 생산은 세계적인 향 전문회사인 IFF(International Flavor & Fragrance Co.)나 Givaudan에서는 90년대 초부터 회사 내부적으로 실시하고 있으나, 학계나 정부 출연 연구소 등에서는 아직 분자생물학적

까지의 미생물조작을 통한 향기물질 생산에 관한 보고가 없어 본 연구의 originality에 의의가 있다.

- 본 과제에서 생산된 Bioessential oil을 식품에 적용 가능성을 알아보기 위하여 본 과제에서 제조된 Bioessential oil들을 식품(쿠키, 마들렌)에 적용시키기 적합한 향이라 판단된 6L Bioessential oil을 향 첨가물로 넣어 쿠키와 마들렌을 제시 시 기존의 시판용 향 첨가물 보다 우수한 기호도를 보였다. 동시에 이 Bioconversion된 천연향의(6L) 안전성을 평가하기 위하여 Mouse를 이용하여 아급성독성 실험을 수행시 무해판정으로 실제 식품산업에 활용가능성을 제시하였다.

제 2 절 고농도 배양 및 대량 bioconversion system 개발

1. 서 론

- 테펜류는 식물체의 2차 대사물로 크게 분류되며 Limonene(4-isopropenyl-1-methylcyclohexene)은 monocyclic monoterpene으로 지구상에 가장 널리 분포되어있는 테펜류로 300개 이상의 식물에 존재한다. Monoterpenes는 두 개의 isoprene 단위로 구성된 C-10 탄화수소로서 40여종 이상이 밝혀져 있다[1].
- 특히 유자에는 많은 정유성분이 함유되어 있는데 유자의 정유성분은 limonene과 같은 monocyclic terpenoid 화합물이며 감귤류 껍질 정유성분의 공통적인 주요성분으로 약 70-95% 정도 차지한다[2]. 유자정유는 값싸고 손쉽게 구할 수 있으며 많은 식품이나 그 밖의 향료산업에 이용되고 있으며 미생물 대사 체계를 이용하여 값비싼 다른 향기 물질로 이용될 수 있는 초기 기질 물질로 이용될 수 있다[3,4,5].
- 기존의 향기물질(flavor & fragrance)의 생산방법은 화학적으로 합성하거나 (인공향) 식물체에서부터 추출(천연향)하여 생산하였다. 천연향을 얻기 위해서는 식물체의 성장 및 추출 공정에 많은 시간이 소요되며 합성향에 비해 더 많은 비용이 소요된다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 연구의 일환으로 미생물을 이용하여 limonene이나 천연향으로부터 고부가가치 향기물질의 생전환을 위한 노력이 많이 시도되었는데, 1960년대 토양으로부터 *Pseudomonas* sp.가 sole carbon source로서 limonene으로 몇 종류의 다른

물질과 산화형태의 물질로 전환시킨다는 것이 보고되었다[6]. 그 외에 많은 세균과 효모를 이용하여 limonene을 다른 terpenoids로 전환시켰다는 보고가 지속적으로 발표되었다[7,8,9].

- 그러나 미생물에 의한 향기물질의 생전환에 관한 연구가 많이 이루어진 반면 limonene 자체가 미생물에 대한 독성이 있어 생전환에 이용하기가 어렵기 때문에 아직 상업적 수준에 달하는 연구는 이루어지지 않고 있는 실정이다[10]. Monoterpenes이 미생물 생산배지에 첨가될 경우 미생물의 성장이 저해되었으며, 높은 농도일 경우에는 미생물이 용해되어, 결국은 사멸한다는 보고가 있다[11,12]. 정유성분만을 유일한 에너지 대사원으로 첨가시 미생물의 낮은 기질 이용능에 따라 충분한 양의 미생물 세포 생장이 이루어지지 않기 때문에 유자정유 생전환을 위해서는 limonene이나 이를 포함한 terpenoid 화합물에 대한 강력한 저항성과 이들 기질 물질을 유일한 탄소원으로 하는 배지에서 높은 세포성장을 이룰 수 있는 유자정유 대사능이 우수한 미생물 개발이 필수적인 사항이다[9,13,14].
- 따라서 본 연구는 bioconversion 기법으로 유자 정유성분을 생전환시키어 고부가가치 향기물질로 대량 전환하여 기존의 유자 농가가 지닌 문제점인 유자의 대량 소비 방안을 제안하는데 있으며, 그 방법으로 기 보유된 유자 정유 및 terpene 화합물의 강력한 대사능에 관여하는 유전자를 함유한 재조합 대장균을 이용하여 1차적으로 유자 정유를 대사하면서도 균체를 대량으로 확보할 수 있는 고농도 bioconversion 시스템을 개발한 다음, 이러한 배양 시스템에 의하여 성장한 균체를 일정한 농도로 조절한 다음, 성장이 정지된 상태에서 유자 정유 또는 limonene을 gas 상태로 공급해주어 연속적으로 bioconversion이 이루어질 수 있는 bioreactor의 최적 조건을 확립한 다음, 최종적으로 생전환 된 향기성분을 효율적으로 회수하는 시스템을 고안하여 대량의 정유성분을 제조하고자 하는 것이 본 연구의 목적이며, 이러

한 연구결과는 최종적으로는 잉여 생산되는 유자로부터 회수된 정유성분을 고가의 다른 천연향으로 전환시키는 시스템을 개발함으로써 농가 소득 증대는 물론 과잉 생산된 유자의 효과적인 처리 방안을 제시할 수 있을 것으로 기대한다.

2. 연구수행 방법

1) 유자박의 전처리

본 연구에 사용된 유자박은 2001년도 완도에서 생산된 유자를 농가로부터 직접 구입하였다. 유자는 구입직후 수세하여 선별한 후 유자를 압착기(실험실에서 자체 제작)를 이용하여 압착하여 유자 착즙액을 분리한 다음, 유자박은 -20°C 에 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 증류에 의한 추출

정유성분을 추출은 최적 추출조건에서 실험하였다. 실험조건은 유자박과 증류수를 1:2로 섞은 다음, 수증기 증류에 의한 방법으로 증기 압력은 $2.5\text{kgf}/\text{cm}^2$ (128°C), 증류시간은 30분으로 하였다. 유자박 200kg을 대량 추출기에 넣은 후 위의 조건과 동일하게 처리하여 170mL(0.17%)의 정유를 얻었다.

3) 재조합 대장균의 고농도 배양

가. 사용 균주 및 plasmid

본 실험에서 사용한 균주는 조선대에서 연구 수행하였던 유자정유 대사능을 지닌 형질전환주 *E. coli* EC4를 사용하였다. 배양에 사용된 균주는 limonene을

탄소원으로하는 M9최소배지(plate)에 도말하여 28℃에서 배양한 것을 사용하였고 균의 활성을 잃지 않기 위해 3주에 한번씩 계대배양을 하였다. 균주보관은 LB 배지(bactopeptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, ampicillin 50 µg/L)에서 배양한 배양액과 glycerol 50%를 1:1로 stock을 만들어 소량씩 나누어 -70℃ 초 저온냉동고에 보관하였다.

나. 시약 및 기구

발효 시 기질로 사용되는 limonene과 생전환 표준물질이 되는 linalool, γ -terpinene, α -terpineol, 그리고 internal standard 물질인 ethyl maltol은 Supelco(Chemical Co.)에서 구입하였고, 4-terpineol, linalool oxide는 (주)RND korea에서 구입하여 사용하였다. Citrus oil은 폐유자박으로부터 수증기 증류에 의해 추출하여 사용하였다.

다. Seed culture

유자정유 대사능을 지닌 형질전환된 *E. coli* EC4는 limonene을 탄소원으로 하는 M9최소배지(plate)에 성장된 colony를 50mL LB broth(50 µg/mL ampicillin)에 접종하여 28℃에서 하루밤 전 배양하여 사용하였다.

라. 고농도 배양 시스템에 의한 형질전환체 생산

전배양된 유자정유 대사능을 지닌 형질전환주 *E. coli* EC4의 고농도 세포 배양을 위해 유가식 배양을 하였다. 배양 배지는 Riesenber medium을 사용하였다. 5L jar fermentor(Korea Fermenter Co., Inchon, Korea)에 멸균된 2L Riesenber medium에 전배양액 1%를 접종하였다. 배양온도는 28℃이며 탄소원의 Feeding 방법으로는 pH-stat로 배양을 하였는데 base로는 NH₄OH[28%(v/v) NH₃], acid로는 glucose가 포함된 feeding solution(700g/L

glucose, 20g/L MgSO₄·7H₂O)을 사용하여 pH 6.7에서 pH 6.8의 범위로 조절되면서 feeding이 되도록 하였다. O.D.600nm 20정도 될 때까지 배양을 하였다.

마. Bioreactor에 의한 형질전환주의 생전환

고농도 배양 방법에 의하여 생산된 형질전환체 2L를 회수하여 원심분리 한 후 상등액은 버리고 cell만 멸균수로 2회 washing한 후 미리 멸균하여 준비된 M9 최소배지 2L에 넣고 온도는 28℃로 5L jar fermentor에서 limonene 생전환 반응을 시켰다. 이때 limonene은 기체상태로 공급하여 주었다. Limonene을 기체상태로 공급하기 위하여 oil-air line의 양을 regulator로 조절하면서 발효조에 limonene을 공급하였다. 또한 발효조 내를 통과하면서 생전환된 bioessential oil은 배양액 뿐 아니라 발효조 내에서 나오는 공기속에 함유되어 있으므로 밖으로 빠져나온 생전환된 bioessential oil을 회수하기 위하여 발효조에서 발생하는 공기를 -40℃의 냉각기를 통과시킴으로 바로 정유상태로 포집하였다. 따라서 Fig. 2와 같은 모형의 bioreactor를 제조하여 실험하였다. 생전환된 화합물의 포집은 1차적으로는 물을 사용하였으며 다음단계로 EtOH 그리고 ether를 순차적으로 연결하여 각 용매에 대한 향기성분의 용해도차를 이용하여 연속적으로 분획을 시도하였다. Table 2-1은 향기성분에 대한 각 용매의 용해도를 정리한 것이다. 대조구로는 형질전환주와 동일한 조건에서 균체만 접종하지 않은 것으로 하였으며, 생전환 반응은 4일정도로 하였으며 배양액을 회수하여 ether 추출에 의한 방법으로 향기성분을 추출하고 GC/MS로 생전환된 물질을 분석하였다.

4) 분석 방법

가. Cell 농도 측정

Cell 농도 측정은 600 nm에서 흡광도로 아래 식에 의거하여 측정하였다.

$$Y = 0.3657 \times X$$

(Y : dry cell weight (g/ℓ), X : absorbance at 600nm)

나. 효소 분리

배양액을 4℃에서 6,000 rpm으로 5분간 원심분리한 다음 lysozyme 처리하여 1시간 동안 실온에 방치하여 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 또한 대량의 세포파괴인 경우에는 homogenizer인 M-110Y microfluidizer(Microfluidics Co., Germany)를 사용하여 균체를 파괴한 후 효소를 분리하였다.

다. SDS-PAGE 전기영동 및 효소의 분자량 측정

효소의 분자량은 SDS-PAGE로 전기영동하여 측정하였다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)방법에 준하였다. 전기영동 한 후 D.W./methanol/glacial acetic acid(5 : 5 : 2 v/v)에 coomassie blue R-250(0.1%)를 녹여 만든 용액에 staining을 하고, D.W./methanol/Acetic acid(6 : 3 : 1)용액에 destaining을 한 후 단백질 band를 확인해 분자량을 측정했다.

라. 정유 성분의 분석

(1) SPME를 이용한 생전환물 추출법

고농도 배양 시 시간에 따라 생전환 된 성분을 바로 추출, GC분석하기 위하여 SPME(Solid Phase Extraction)법을 사용하였다. SPME fiber로는

polydimethylsiloxane(100 μm)를 사용하였고, 추출방법은 발효조로부터 나온 기체상태의 생전환 물질을 SPME fiber로 30분 흡착시킨 후 GC에 injection하여 10분 탈착시켜 GC로 분석하였다.

(2) Ether 추출법

두 번째 방법은 고농도 배양이 끝난 뒤 회수되어진 생전환 물질을 분리하기 위하여 ether로 추출한 후 N₂ stream으로 농축하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. Ether 추출방법은 Fig. 2-2에 간단히 도식화하였다.

(3) GC/MS 분석

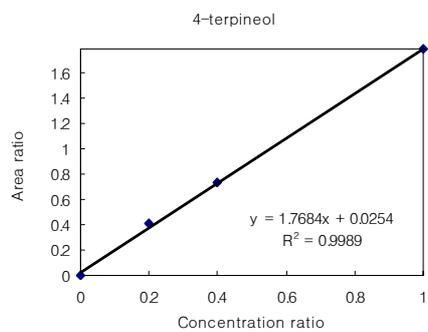
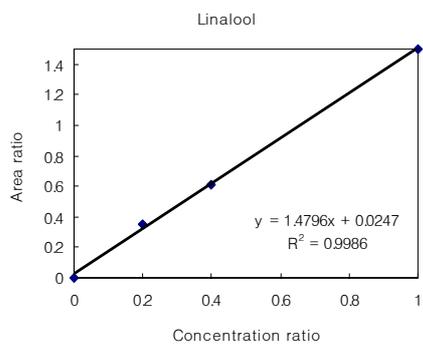
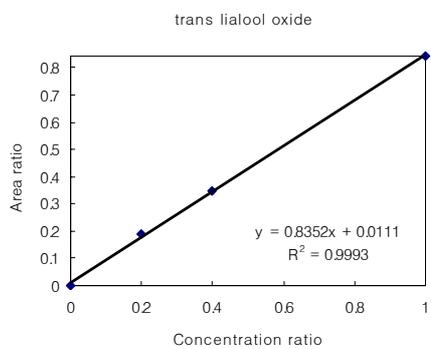
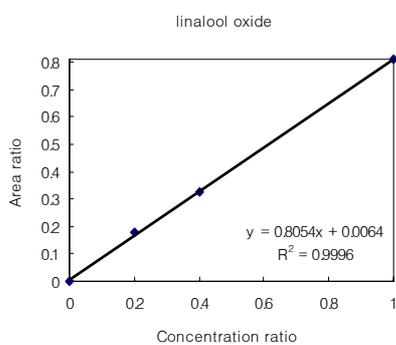
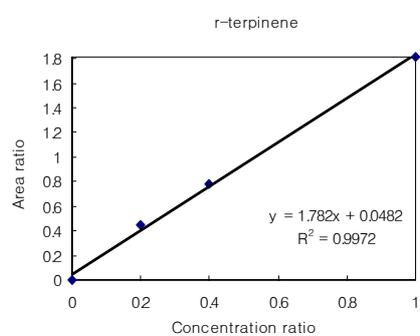
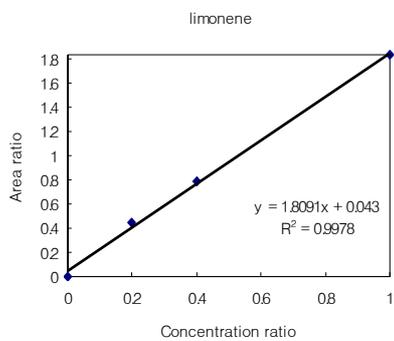
형질전환주가 생산한 성분의 종류를 GC/MS를 통하여 분석하였다. 배양액 100 mL를 회수하여 pH 2.0으로 맞춘후 원심분리하여 상등액을 얻었으며 0.45 μm filtration으로 여과하고 동량의 ether로 2회 추출하고 N₂ gas로 농축시켜 최종 100 μL 를 얻은 것을 GC/MS 분석용 샘플로 하였다. 이때 internal standard인 ethyl maltol을 1000 ppm의 농도로 상등액에 넣고 ether 추출을 하였다. 추출된 샘플은 GC/MS-1210(동일시마즈)으로 1 μL injection하여 분석을 하였다. 사용된 column은 ZB-5(0.35mm i.d. \times 30m length \times 0.33 μm df)이며, 분석조건은 Table 2과 같다. GC/MS로 얻어진 결과물로부터 NIST27, NIST147, WILEY7 library에 의해 data searching하여 얻은 데이터와 alkanes standard(C10-C30)로 분석된 RI값을 비교하여 최종적으로 생전환된 물질을 분석하였다. Standard 물질limonene, linalool oxide, ψ -terpinene, α -terpineol, 4-terpineol, linalool 그리고 trans linalool oxide의 농도에 대한 peak값으로부터 내부 표준 물질법에 의하여 표준곡선을 작성하여 Fig. 2-1의 검량선 으로부터 정량분석에 사용하였다. 또한 유사박으로부터 증류에 의해 추출된 정유성 분도 위와 같은 방법으로 GC/MS 분석하였다.

Table 2-1. 용매에 대한 volatile compounds의 용해도 특성

Compounds	Solubility			
	Water	Ethanol	propylene glycol	oil
Limonene	Insoluble	Soluble	poorly soluble	-
ψ-terpinene	Insoluble	Soluble	-	Soluble
Linalool	slightly soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Cineole	ice cold water 0.6% soluble room temp. water 0.4% soluble	Miscible	Soluble	Miscible
Trans linalool oxide	slightly soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Linalool oxide	slightly soluble	Soluble	Soluble	Soluble
α-terpineol (cold 상태-응고, 35°C-녹음)	slightly soluble	Soluble	Soluble	Mineral oil soluble
4-terpineol	slightly soluble	Soluble	Soluble	Soluble
1-octanal	0.05% soluble	Miscible	-	Soluble

Table 2-2. Gas-chromatography operation condition

Column	ZB-5
Injector	250°C
Detector	250°C
Column	40 - 220°C 2°C/min up to 150°C 4°C/min up to 220°C with a 3min initial hold time
Injection	1μl



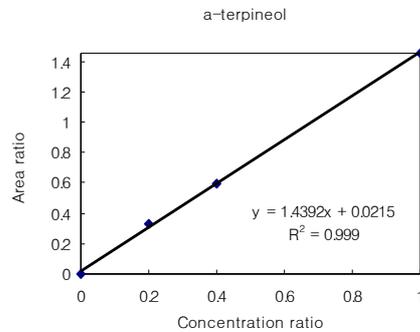


Figure 2-1. Standards curve about internal standard method.

3. 고농도 배양용 bioreactor 제조 및 고농도 배양

1) 고농도 배양 및 생전환용 bioreactor의 제조

유자 정유 및 생전환 된 bioessential oil이 대장균에 toxic하게 작용하기 때문에 직접 액상으로 배양액에 공급할 수 없기 때문에 이를 극복할 수 있는 특수한 bioreactor가 필요하다. 따라서 생전환 기질인 유자정유를 기체상태로 발효조 내에 공급되는데, 공급되는 유자정유량은 공기량에 비례하게 된다. 그러므로 compressor로부터 발생하는 공기의 양은 일정하기 때문에 발생하는 공기를 pure-air line과 oil-air line으로 분리하고, oil-air line의 양을 regulator로 조절하면서 발효조 내에 공급되는 정유량을 조절하였다. 또한 발효조 내를 통과하면서 생전환 된 bioessential oil은 발효조 내에서 나오는 공기 속에 함유되어 있으므로 이를 회수하기 위하여 발효조에서 발생하는 공기를 -70℃의 냉각기를 통과시킴으로 바로 정유상태로 포집하였다. 따라서 Fig. 2-2와 같은 모형의 bioreactor를 제조하였고, Fig. 2-1과 같은 모형도에 의거하여 bioreactor를 제조하여 실험하였다.

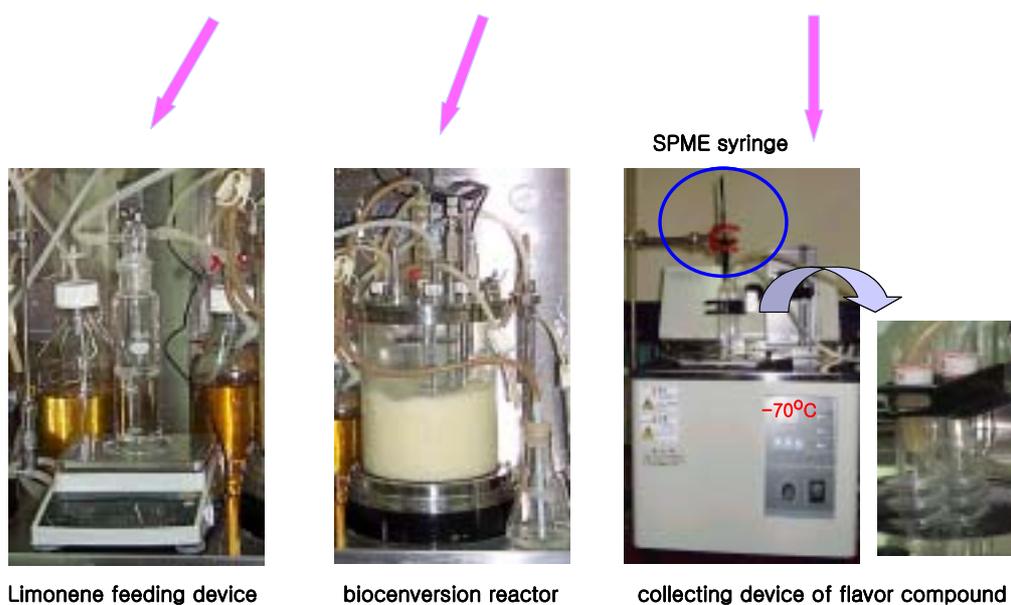
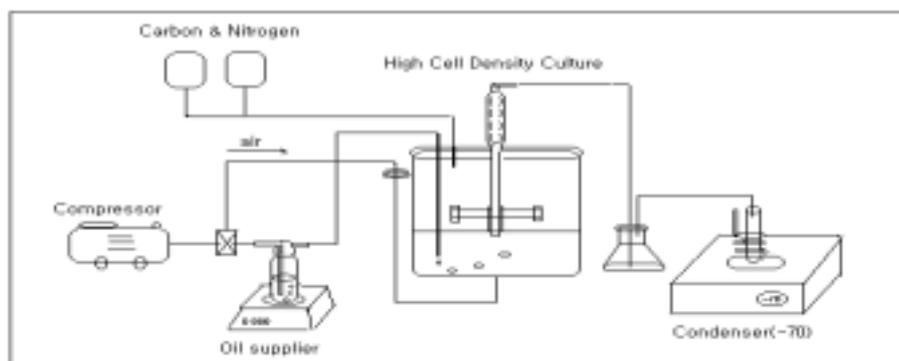


Figure 2-2. Bioconversion process for mass production of the Bioessential oils.

2) 재조합 대장균의 고농도 배양 조건 최적 확립

가. HCDC 배지와 배양온도의 선택

유가식 배양에 적합한 배지를 선택하기 위하여 Semi-defined medium의 과 Riesenber media를 사용하여 비교했고, 최적 온도를 결정하기 위하여 28, 37 그리고 40℃의 온도에서 Semi-defined media과 Riesenber media에서 배양을 하여 비교하였다. 형질전환주 EC3, EC4, EC6 균주 중 EC4 균주에 대하여 최적온도와 최적 배지를 수행하였다.

Semi-defined media과 Riesenber media에서의 영향을 보면 Riesenber media, Semi-defined media의 순이었으며, maximum DCW는 Semi-defined media, Riesenber media 순이었다(Tables 2-4). 온도에 따른 영향을 보면 Semi-defined media의 배지에서는 온도 28℃에서 maximum DCW는 17.91g/L로 37℃와 40℃에서보다 높았고 Riesenber media에서의 결과에서도 28℃에서 maximum DCW는 23.03g/L로 다른 온도에서 배양하였을 때보다 높은 생산량을 보여 Semi-defined media에서의 결과와 유사함을 보였다. 따라서 유가식 배양에 가장 적합한 조건으로 온도는 28℃이며 배지는 Riesenber media였다 (Fig. 2-3).

Table 2-3. Effect of culture temperature in Semi-defined medium of fed-batch culture

Temp.(℃)	Maximum DCW ¹⁾ (g/L)
28	17.9193
37	22.3077
40	31.4502

¹⁾ DCW : Dry cell weight

Table 2-4. Effect of culture temperature in Riesenbergl medium of fed-batch culture.

Temp.(°C)	Maximum DCW ¹⁾ (g/L)
28	23.0391
37	18.285
40	20.4729

¹⁾ DCW : Dry cell weight

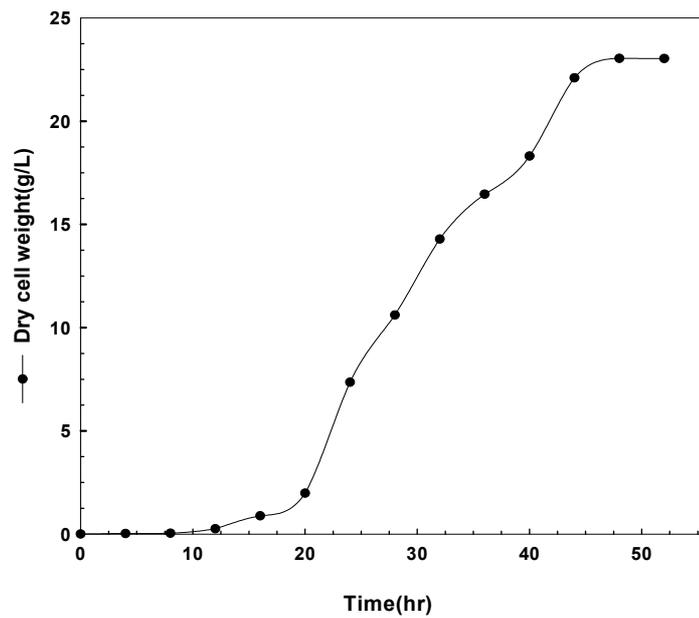


Figure 2-3. Profile of high cell density culture for *E. coli* EC4 at 28°C in Riesenbergl medium.

-•- : Dry cell weight(g/L)

나. 무기태 질소원 첨가 시 영향

Feeding solution에 최적 무기태 질소원인 NaNO₃를 농도별로 0 g/L, 1 g/L, 5 g/L을 첨가하여 실험하여 세포성장을 비교하였다. 배양온도는 28℃로 하였으며 4시간마다 샘플링하여 균체량을 측정하였고 무기태 질소원인 NaNO₃를 5 g/L 넣어주었을 때 최대 균체량이 35.4 g/L로 가장 높았다(Table 2-5). 그러나 NaNO₃ 첨가량과 균체량 증가와의 관계를 고려하여 향후 feeding solution에는 1g/L의 농도로 NaNO₃를 첨가하여 사용하였다.

Table 2-5. Effect of NaNO₃ concentration in feeding solutions at Riesenbergr medium of fed-batch culture for the *E. coli* EC4.

NaNO ₃ concentrations(g/L)	Maximum DCW ¹⁾ (g/L)
0	23.0391
1	30.4006
5	35.6080

¹⁾ DCW : Dry cell weight

다. 형질전환주의 고농도 배양

Risenbergr 배지에 온도 28℃ 그리고 1g/L의 NaNO₃를 feeding solution에 첨가하여 세가지 균주 *E. coli* EC3, EC4, EC6에 대하여 고농도 배양을 수행하였다. 형질전환주의 고농도 배양특성을 살펴보면 *E. coli* EC3와 EC4는 배양 16시간 이후부터 활발한 세포생장을 이루어 *E. coli* EC3는 33.13 g/L(배양 48시간), *E. coli* EC4는 33.8 g/L(배양 48시간)으로 높은 세포생장을 보였다. 한편 *E. coli* EC6는 다른 형질 전환주 들에 비해 유도기간이 길었으며 28시간 이후부터 세포생장이 활발하였으며 *E. coli* EC6의 배양 시간과 최대 균체 생산량은 72시간, 35.8 g/L이었다(Table 2-6, Fig.2-4). 배양 특성에 따른 결과를 보

면 EC3와 EC4가 EC6에 비하여 더 빨리 성장함을 보였다.

Table 2-6. Summary of high cell density culture.

	Maximum culture time(hr)	Maximum dry cell weight(g/L)
<i>E. coli</i> EC3	48	33.13
<i>E. coli</i> EC4	48	33.82
<i>E. coli</i> EC6	72	35.80

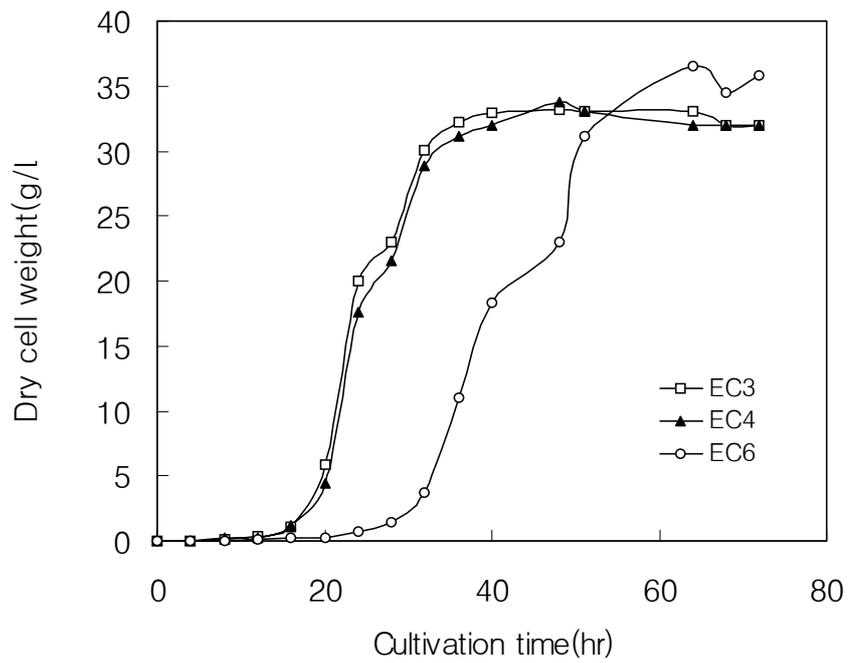


Figure 2-4. Profile of high cell density culture for *E. coli* EC3, EC4 and EC6.

라. Limonene 공급 시 고농도 배양의 최적화

(1) 초기 glucose의 최적 농도

재조합 대장균의 고농도 배양을 위하여 유가식 배양공정을 이용하여 실시하였다. 배양시 발효조 내의 기질 고갈 또는 공급과잉에 의한 저해 작용이 발생하지 않도록 기질 주입속도를 조절하여 실시하였다. 재조합 대장균이 limonene을 Bioessential oil로 생전환시키기 위해서는 대장균의 기질로써 limonene을 기체상태로 공급을 해야 한다. 따라서 탄소원으로써 기질이 glucose 외에 유자정유가 공급이 되므로 초기 glucose 함량이 균체 수율과 생전환률에 영향을 미칠 것이다. 따라서 초기 glucose 농도를 1 g/L와 10 g/L로 달리하여 배양을 수행하였다. 배양 시 limonene을 기체상태로 공급하면서 배양을 하였고, 배양 중 배지내의 생전환 물질은 SPME법으로 행하였으며 GC로 분석을 하였다. Fig. 2-5에서 보는 것과 같이 1 g/L와 10 g/L에서의 최대 균체 수율(DCW)을 보면 38.58 g/L와 15.33 g/L로 초기 glucose 농도를 1 g/L로 했을 때 2.5배정도 높았다.

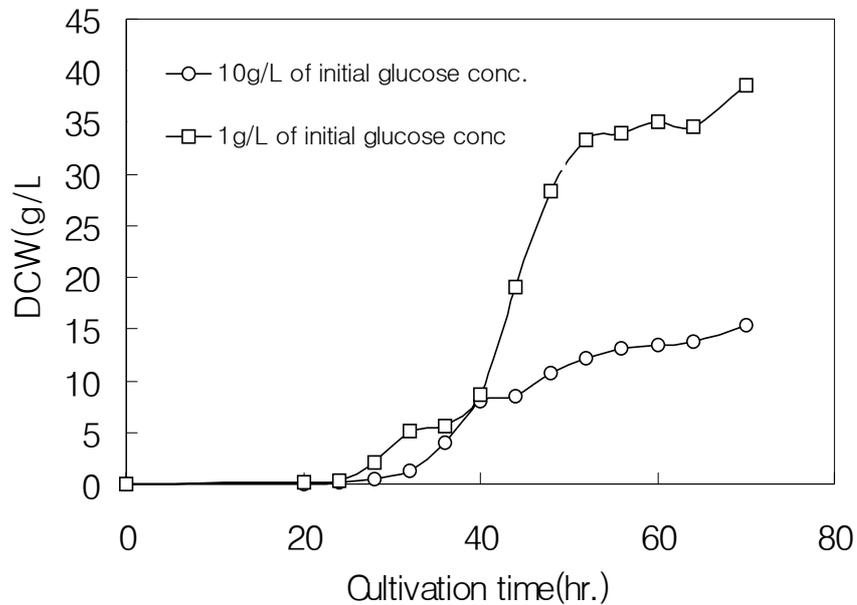


Figure 2-5. Profile of high cell density culture for *E. coli* EC4 when initial concentration of glucose was 1 g/L and 10 g/L.

(2) Feeding solution의 최적화

배지 내 탄소원이 고갈되었을 때 feeding solution의 주입에 의해서 고농도 배양으로 이루어진다. 유자정유를 발효조 내에 기체 상태로 연속적으로 공급함으로써 인해 feeding solution조성에 의해서 최대 균체 수율과 생전환률에 영향을 미칠거라 예상된다. 따라서 feeding solution 조건을 glucose 농도를 200g/L와 700g/L로 각각 달리하여 실험을 하였다. 결과 feeding solution 조건이 700g/L일 경우 고농도로의 배양으로 이루어졌지만 200g/L glucose일 경우에 균체수율이 낮음을 볼 수 있었다(Fig. 2-6). 따라서 limonene을 공급할 경우의 feeding solution 최적 조건은 700g/L glucose, 20g/L MgSO4였다.

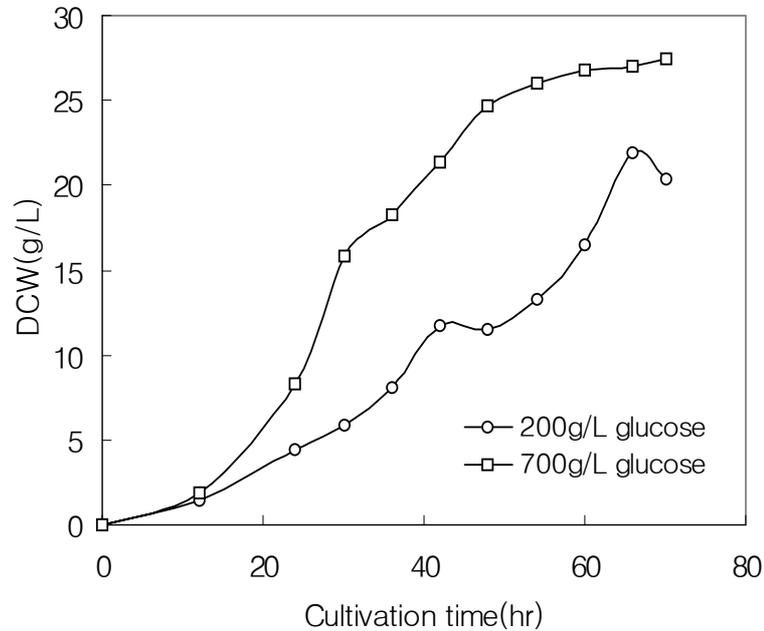


Figure 2-6. Profile of high cell density culture for *E. coli* EC4 when initial concentration of glucose was 1 g/L and 10 g/L.

(3) SDS-PAGE에 의한 효소분자량 측정

형질전환체에서 분리한 효소의 분자량을 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 2-7). 그림에서 보는 것과 같이 pUC18에서 볼 수 없는 하나의 밴드가 형질전환주 EC4에서 나타났으며 그 분자량은 대략 55 KDa으로 추정할 수 있었다. 또한 형질전환주가 IPTG에 의하여 induction에 영향을 미치는지 실험하기 위하여 IPTG를 넣고 배양하여 얻은 형질전환주의 효소를 SDS-PAGE를 통하여 알아보았다. 결과 전기영동 그림을 보면 EC4에서 생성된 하나의 밴드를 찾아 볼 수는 없었다. 따라서 형질전환주 EC4는 효소 induction은 IPTG에 의해 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

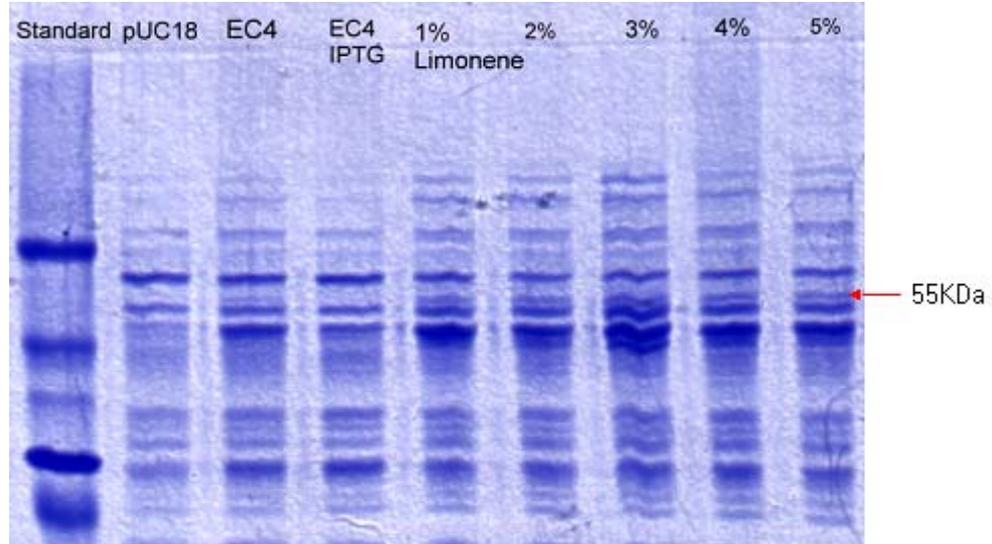


Figure 2-7. SDS-PAGE analysis of molecular weight from *E. coli* EC4.

마. 고농도 배양 시 생육 시기에 따른 생전환 화합물 분석

고농도 배양의 최적조건하에서 형질전환주의 생육시기에 따른 그 대사산물(향기성분)을 비교분석하였다. 대조구로는 같은 온도에서 같은 배양시간동안 동일한 조건에서 limonene이 공급되지 않은 것으로 삼았다. 생전환 된 물질은 배양중 -70°C cold bath에서 시간별로(24, 48, 72시간) 포집된 정유를 ether 추출하여 GC로 분석하였다. 대조구는 시간별로 포집된 것 중 마지막 것을 ether 추출하여 GC분석하여 생전환 된 물질과 비교하였다. 형질 전환주가 생산한 생전환 된 물질중 시간이 지남에 따라서 linalool이 가장 많이 생성되었으며 배양 시간 72시간째 최고에 달하였다(Table 2-7, Fig. 2-8,9). 그 외에 4-terpineol, α -terpineol, nerol, verdiflorol등이 검출되었다. Fig. 8은 시간에 따른 생전환물질의 변화량을 나타낸 그림이다.

Table 2-7. Bioconversion products of *E. coli* EC4 at 28°C

Compounds	RI	Peak area(%)				
		Control	Limonene control	24hr	48hr	72hr
3-hexane-1-ol	1380	N.D.	N.D.	0.0891	1.1886	0.7686
Acetic acid	1420	N.D.	N.D.	1.1428	0.2135	0.9844
Linalool	1555	N.D.	2.4077	0.6829	2.7895	5.7962
Fenchyl alcohol	1576	0.1587	N.D.	4.4127	0.8096	1.4626
4-Terpineol	1595	N.D.	N.D.	0.0755	0.5235	0.1799
Vallerol actone	1619	N.D.	N.D.	0.1820	0.9825	1.4268
β-cis-Farnesene	1634	N.D.	N.D.	1.7772	0.1084	0.2149
β-Terpineol	1654	N.D.	0.2969	0.2071	0.2579	0.5482
α-terpineol	1730	0.1675	N.D.	0.5233	0.4647	1.9420
Neryl isobutyrate	1767	N.D.	N.D.	1.0318	0.4847	0.6357
Nerol	1806	N.D.	N.D.	0.7363	0.0624	0.1582
Terpinyl-n-valerate	1927	0.1972	N.D.	0.5908	0.2237	0.0652
veridiflorol	2087	0.1762	N.D.	0.0488	0.0363	0.7503

N.D. : Not detection

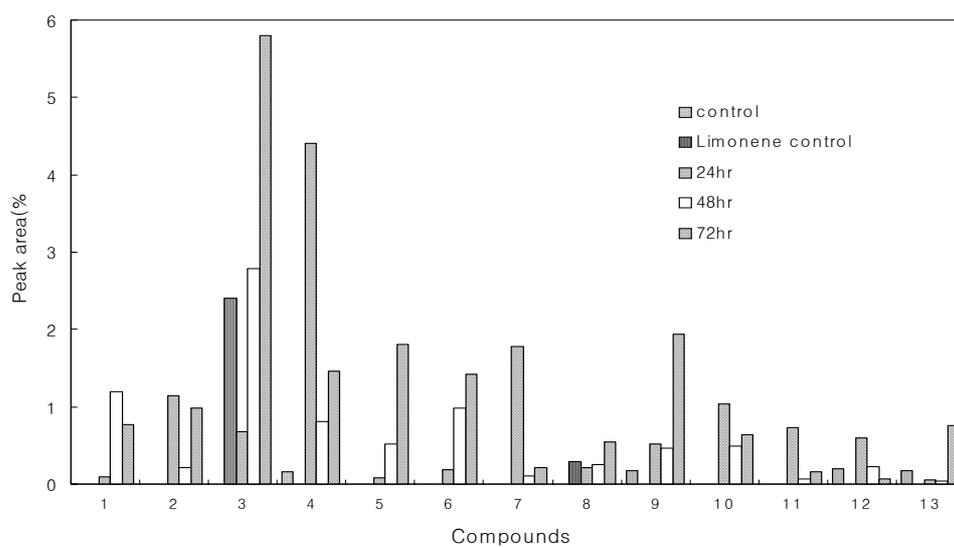


Figure 2-8. Peak area(%) of the main metabolites produced from HCDC culture of *E. coli* EC4.

(Compounds - 1 : 3-hexane-1-ol, 2 : Acetic acid, 3 : **Linalool**, 4 : Fenchyl alcohol, 5 : 4-terpineol, 6 : Vallerol actone, 7 : β -cis-Farnesene, 8 : δ -Terpineol, 9 : α -terpineol, 10 : Neryl isobutyrate, 11 : Nerol, 12: Terpinyl-n-valerate, 13 : veridiflorol)

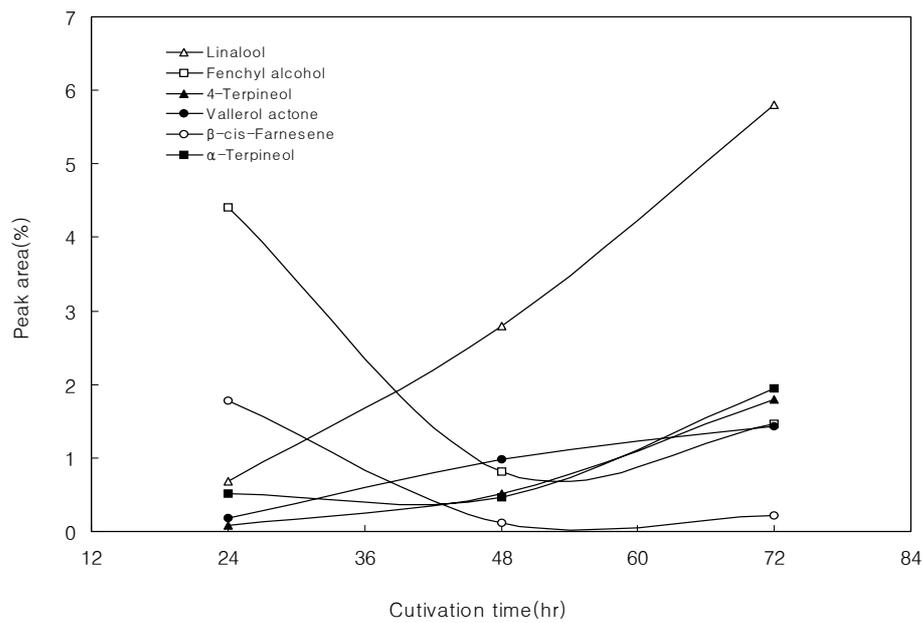


Figure 2-9. Peak area(%) of the main metabolites produced from HCDC culture of *E. coli* EC4.

4. 고농도 배양시 induction 조건의 최적화 및 연속 생전환 공정 구축

1) 유자 정유의 최적 공급량 결정

가. 시간당 limonene feeding 소모량과 회수량 측정

시간당 limonene feeding 소모량과 회수량을 측정하기 위하여 고농도 배양 방법과 같은 조건 하에서 균을 접종하지 않고 실험하였다. 미량저울을 사용하여 limonene이 feeding되어 소모되는 양을 실시간으로 측정하여 시간당 소모량을 구했으며, air의 공급 속도는 1vvm, 2vvm, 3vvm으로 각각 실험을 하였다. limonene의 소모량과 회수량은 각 follow rate에 따라서 측정하였다. 측정된 결과는 1vvm flow rate일 때 limonene 공급량은 시간당 0.34 mL/hr였으며 2vvm은 1.05 그리고 3vvm은 2.09 mL/hr였다(Table 2-8).

Table 2-8. Limonene input and out put of limonene feeding rate of air supply.

Flow rate(vvm)	Limonene input(mL/hr)	Limonene output(mL/hr)
1	0.34	0.35
2	1.05	0.6
3	2.09	1.05

나. 고농도 배양 시 limonene feeding 최적조건

고농도 배양 시 *E. coli* pEC4의 limonene feeding의 최적조건을 구하기 위하여 air flow rate를 1, 2, 3 vvm으로 각각 나누어서 실험하였다. limonene

feeding 조건을 달리 하였을 경우의 cell의 성장을 비교하였고, 생 전환된 화합물의 생성량을 분석하였다. 대조구로는 같은 온도에서 같은 배양시간동안 동일한 조건에서 *E. coli* pUC18을 limonene feeding을 1vvm으로 공급하여 배양한 것으로 하였다. 형질 전환주 *E. coli* pREC4의 성장곡선을 보면 1vvm으로 feeding하였을 경우 2, 3vvm보다 초기 성장률이 빨랐으며 배양시간이 지남에 1vvm과 2vvm의 생장은 배양 40시간이 지난 후에 거의 비슷한 수준으로 배양되었으며 3vvm의 경우 1, 2vvm의 조건으로 배양하였을 경우와 비교하면 전체적으로 균의 성장이 더딤을 볼 수 있었다. 대조구인 *E. coli* pUC18를 보면 배양 40시간이후부터는 사멸기로 균의 성장이 멈춤을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2-10).

생전환물은 1일째부터 하루간격으로 4일째까지의 배양액을 ether추출하여 GC 분석을 통하여 비교 분석하였다(Table 2-9,13, Fig. 2-11). *E. coli* pEC4의 경우 1vvm에서 2일째 배양한 배양액 분석결과 linalool과 α -terpinene의 생성량이 각각 486 mg/L와 1126 mg/L로 2vvm의 205 mg/L와 586 mg/L, 3vvm의 102 mg/L와 562 mg/L보다 더 많이 생성되었고, limonene feeding을 1vvm, 2vvm, 3vvm에서 생전환물의 배양 4일동안의 생성량을 비교해보면, 1과 2vvm에서 linalool은 비슷한 생성량을 보였으며 3vvm에서는 가장 낮은 양을 보여주었으며, α -terpinene의 경우에는 1vvm이 전체적인 생성량이 2, 3vvm보다 높음을 알 수 있었다. 따라서 시간당 0.34 ml/hr로 공급되는 limonene의 양은 1vvm에서 bioconversion product가 충분히 생성될 수 있음을 알 수 있었고, 앞으로의 형질전환체 *E. coli* pEC4의 고농도 배양의 limonene feeding 조건을 1vvm으로 정하였다.

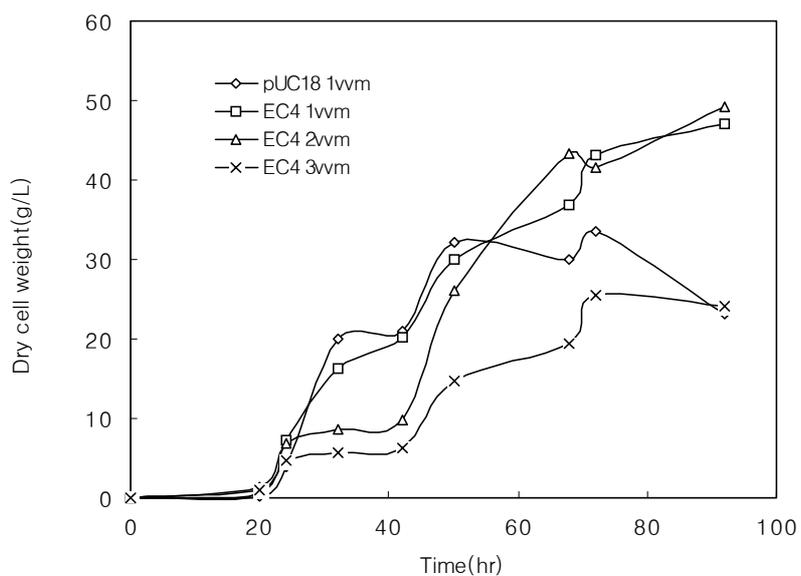


Figure 2-10. Profile of high cell density culture for *E. coli* EC4. Limonene was fed in amount of 1, 2 and 3vvm.

Table 2-9. Comparison of bioconversion product from 2day culture broth.

	Product concentration(mg/L)		
	limonene	ψ-terpinene	linalool
<i>E. coli</i> pUC18 + 1vvm	796	0	-
<i>E. coli</i> EC4 + 1vvm	27	486	1126
<i>E. coli</i> EC4 + 2vvm	53	205	568
<i>E. coli</i> EC4 + 3vvm	83.47	102	562

Table 2-10. Bioconversion products of *E. coli* pUC18 for limonene feeding at 1vvm air supply.

compounds	RI	peak area(mV*s)			
		1day	2day	3day	4day
limonene		100	658	558	95
3-hexane-1-ol	1380	-	-	17	-
acetic acid	1420	2883	14443	18867	13833
linalool	1555	78	13.7	-	-
4-terpineol	1595	-	-	-	-
vallero lactone	1619	-	-	-	-
β-cis-farnesence	1634	-	-	64	-
α-terpineol	1730	57	-	-	-
neryl isobutyrate	1767	-	-	-	-
nerol	1806	-	-	-	-
terpinyl-n-valerate	1927	-	-	-	-
veridifloral	2087	-	-	-	-

Table 2-11. Bioconversion products of *E. coli* EC4 for limonene feeding at 1vvm air supply.

compounds	RI	peak area(mV*s)			
		1day	2day	3day	4day
limonene		183	42	232	67
3-hexane-1-ol	1380	-	4.86	-	-
acetic acid	1420	42	2061	2089	13560
linalool	1555	2.2	280	2115	103
4-terpineol	1595	-	318	256	22
vallero lactone	1619	-	-	-	128
β-cis-farnesence	1634	-	-	64	-
α-terpineol	1730	-	38569	67103	927
neryl isobutyrate	1767	-	9939	-	-
nerol	1806	-	256	-	-
terpinyl-n-valerate	1927	-	257	-	-
veridifloral	2087	-	10946	5246	483

Table 2-12. Bioconversion products of *E. coli* EC4 for limonene feeding at 2vvm air supply.

compounds	RI	peak area(mV*s)			
		1day	2day	3day	4day
limonene		493	52	627	70
3-hexane-1-ol	1380	494	-	-	152
acetic acid	1420	40	4750	598	10272
linalool	1555	-	24	143	820
4-terpineol	1595	-	-	-	15
vallero lactone	1619	-	720	-	23
β-cis-farnesence	1634	-	-	-	249
α-terpineol	1730	42	6469	67103	927
neryl isobutyrate	1767	-	-	-	-
nerol	1806	-	-	-	-
terpinyl-n-valerate	1927	-	545	-	-
veridifloral	2087	-	108	2728	963

Table 2-13. Bioconversion products of *E. coli* EC4 for limonene feeding at 3vvm air supply.

compounds	RI	peak area(mV*s)			
		1day	2day	3day	4day
limonene		985	225	22	132
3-hexane-1-ol	1380	-	5.7	679	-
acetic acid	1420	6795	4795	11125	-
linalool	1555	-	170	167	37
4-terpineol	1595	134	99	26	2179
fenchyl alcohol	1619	-	11	-	-
β-cis-farnesence	1634	-	-	-	249
α-terpineol	1730	2466	37456	-	-
neryl isobutyrate	1767	-	1867	-	-
nerol	1806	-	-	-	-
terpinyl-n-valerate	1927	208	40642	-	-
veridifloral	2087	3.2	15579	-	7219

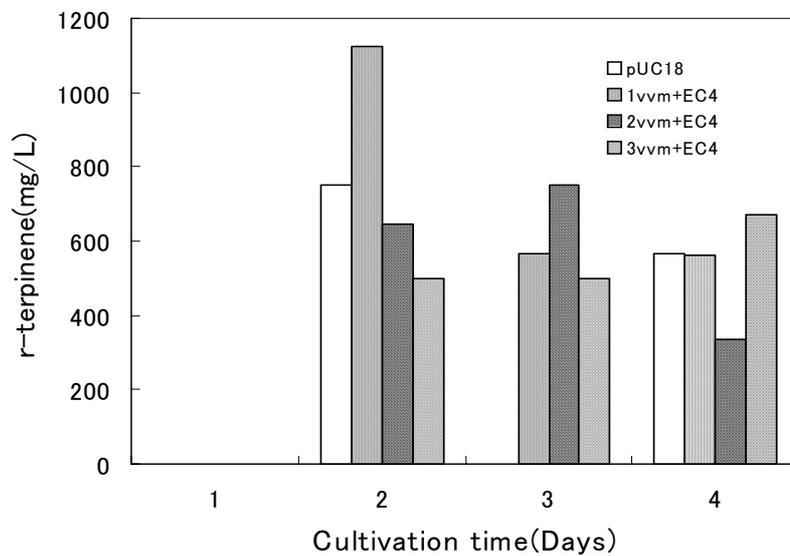
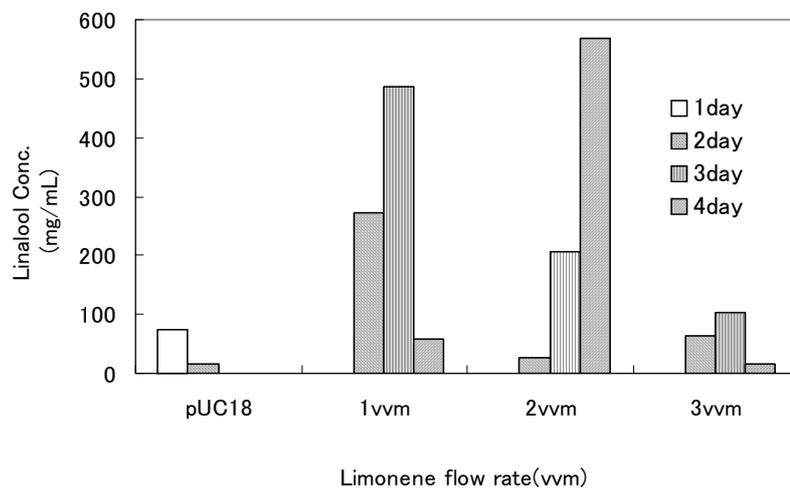


Figure 2-11. Product recovered from the bioconversion by HCDC of *E. coli* pUC18 and pEC4 When limonene was fed in amount of 1, 2 and 3vvm.

2) 최적 연속 전환 시스템 확립

가. 고농도 배양 시 생육 시기에 따른 생전환 화합물 분석과 생전환률

앞에서 실험하여 얻은 limonene feeding 최적 조건인 1vvm에서 고농도 배양을 통한 형질전환주 *E. coli* pEC4의 생육시기에 따른 그 대사산물(향기성분)을 비교 분석하였다. 대조구로는 같은 온도에서 같은 배양시간동안 동일한 조건에서 *E. coli* pUC18으로 하였다. 4일동안 하루간격으로 배양액을 샘플링 하였으며 내부표준물질을 섞어서 추출하였다. 배양액을 분석한 결과 형질 전환주가 생산한 생전환 된 물질 중 linalool은 시간이 지남에 따라서 3일째 540 mg/L로 가장 많이 생성되었으며 배양시간 72시간째 최고에 달하였다(Table 2-14,17). 그 외에 γ -terpinene, 4-terpineol, α -terpineol, octanol등이 검출되었다.

고농도 배양 하에서 형질전환주(*E. coli* pEC4)의 생육시기에 따른 limonene의 생전환률을 비교 분석 하였다. 대조구로는 같은 온도에서 같은 배양시간동안 동일한 조건에서 limonene이 공급되지 않은 것과 같은 조건에서 *E. coli* pUC18 배양한 것으로 하였으며, 또 다른 대조구로는 균을 접종하지 않은 배지에 limonene을 feeding하여 ether로 추출하여 얻은 것으로 하였으며 결과는 Table 2-14과 같다. 생전환률을 구하기 위하여 배지 내 limonene 함량을 구하여 control과 비교하여 생전환률을 계산하였다. 생전환률을 비교하여 정리한 것은 Table 2-15에 나타냈다. 결과를 보면 *E. coli* pEC4의 limonene 전환률은 99%에서 89%정도가 다른 물질로 전환되었으며, control과 비교하여 보면 *E. coli* pUC18의 경우 limonene 함량은 1169 mg/L로 다른 물질로의 전환이 없음을 보여주었다.

Table 2-14. Bioconversion products of *E. coli* EC4 at 28 °C.

Compounds	Peak area(mV*s)			
	1day	2day	3day	4day
Limonene	454	832	-	123
ψ-terpinene	-	-	80	125
Acetic acid	403	2395	12241	44487
Linalool	85	3048	454	-
Otanol	-	19298	2053	72049
α-terpineol	53	80112	461	-
ethyl maltol	177773	214411	3640	21469

Table 2-15. Amount of bioconversion products.

	Limonene		ψ-terpinene	Linalool
	conc. (mg/L)		conc.(mg/L)	conc.(mg/L)
	pUC18	EC4	EC4	EC4
1 day		10.1	-	18
2 day	1169	2.3	-	54
3 day		-	9.5	540
4 day		38	4.7	-

Table 2-16. Limonene concentration of control(no inoculation) in broth.

Flow rate(vvm)	Limonene concentration(mg/L)
1	1329
2	1710
3	2684

Table 2-17. Limonene concentration of *E. coli* TG1(pUC18) and *E. coli* TG1(pEC4) in culture broth of 1vvm air supply.

Fermentation days(1vvm)	Limonene concentraion(mg/L)		
	<i>E. coli</i> TG1(pUC18)	<i>E. coli</i> TG1(pEC4)	Bioconversion yield(%)
1day		10.1	99
2day	1169	2.3	89
3day		-	99
4day		38	99

3) Bioessential oil의 회수 방법

가. Bioessential oil의 회수 방법 확립

유자 정유 및 생전환 된 bioessential oil이 대장균에 toxic하게 작용하기 때문에 직접 액상으로 균에 feeding 할 수 없기 때문에 이를 극복할 수 있는 특수한bioreactor가 필요하다. 일차년도에 보고된 바와 같이 특별히 고안된 장치를 사용하여 고농도 배양 최적화를 실시하였다. 공급되는 유자 정유는 발효조를 통과하여 air 형태로 밖으로 나오게 되는데 이때 나오게 되는 생전환 된 유

자정유를 포집하여 회수율을 높이기 위한 방법으로 -70°C 냉각기를 사용하였다. 그러나 발효조로부터 빠져나온 air는 100% 기체상태이지 않고 배양액의 일부도 함께 섞여있으므로 -70°C 에서는 어는 현상이 일어난다. 따라서 이러한 단점을 보완하기 위하여 Fig. 2-12와 같은 장치로 보완을 하였다. 그림을 보면 발효조에서 발생하는 air를 일차적으로 증류수를 통과시킨 후 공기 속에 어느 정도 함유되어있는 배양액을 제거하기 위하여 EtOH층으로 통과시켰다. 이때 증류수층과 EtOH층은 얼음 안에 채워놓은 상태로 저온을 유지시켰다. EtOH층을 통과한 air는 -70°C 의 EtOH층을 통과하여 정유상태로 포집하였다. 따라서 발효조안의 배양액을 일차적으로 회수하여 분석하고, 세 단계를 통과한 증류수층, EtOH층, -70°C 의 EtOH층을 분석하였다.

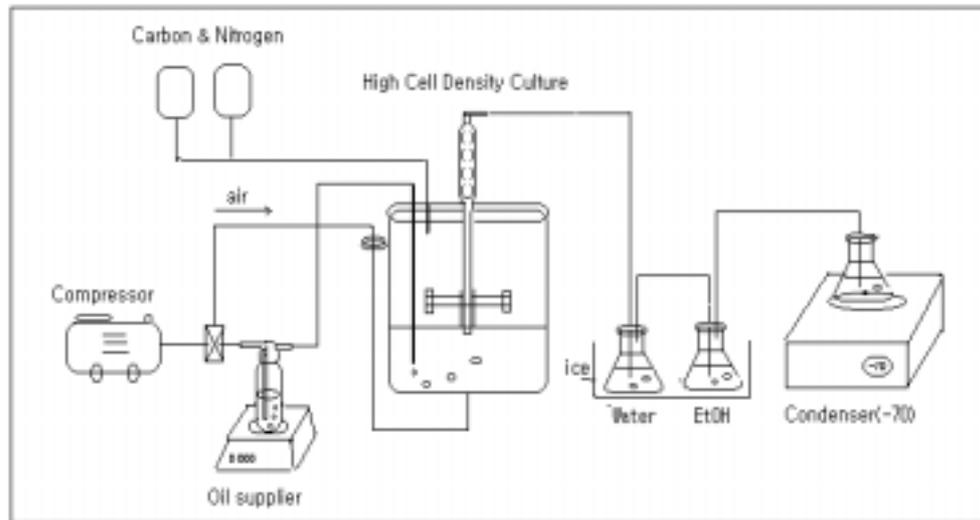


Figure 2-12. Collecting device for mass production of the Bioessential oils.

나. 생육시기에 따른 용매에서의 생전환물 회수 분석

분석방법은 먼저 배양액과 증류수 층, EtOH층은 ether추출을 하였으며 앞에서 기술한 방법으로 하였고 GC분석을 하여 비교하였다. 결과를 보면 -70℃ EtOH층에서는 Ψ -terpinene과 limonene, α -terpineol이 검출되었다(Table 2-18). EtOH층은 linalool과 α -terpineol을 볼 수 있었다. linalool은 배양 첫째날에서 셋째날까지 검출되었으며, linalool과 α -terpineol은 3째날 각각 125와 260 peak area(mV*s)로 가장 높았다(Table 2-19). 증류수층에서는 linalool 함량이 첫 번째날 최고로 145979 peak area로 가장 높았으며, EtOH층에서 볼 수 있었던 Ψ -terpinene는 검출되지 않았으며, octanal이 첫 번째 배양일 날 볼 수 있었다(Table 2-20). 배양액층에서는 Ψ -terpinene, α -terpineol, vallerolaton, nerol, 4-terpineol 등이 생성되었으며 배양액층에서 생전환물이 많이 검출되었으나 배양액만 회수할 경우보다는 각 층에서 분석된 전환물의 회수로 인하여 전체적인 회수율을 높일 수 있을 것으로 사료된다(Table 2-21).

Table 2-18. Analysis of bioconverted compounds which was captured in ethanol at -70℃.

Compounds	Peak area(mV*s)			
	1day	2day	3day	4day
Limonene	158	-	2.3	3.3
Ψ -terpinene	7.23	9.77	-	-
Linalool	-	-	-	-
α -terpineol	50	2.6	3.1	3.6

Table 2-19. Analysis of bioconverted compounds in ethanol layer at -0°C.

Compounds	Peak area(mV*s)			
	1day	2day	3day	4day
Limonene	-	-	-	-
ψ-terpinene	-	-	-	-
Linalool	120	60	125	-
α-terpineol	75	-	260	-

Table 2-20. Analysis of bioconverted compounds in cold water layer at -0°C.

Compounds	Peak area(mV*s)			
	1day	2day	3day	4day
Limonene	-	33	17	-
ψ-terpinene	-	-	-	-
Linalool	87	-	-	-
α-terpineol	14.6	6.4	406	972

Table 2-21. Analysis of bioconverted compounds in culture supernatant.

Compounds	Peak area(mV*s)			
	1day	2day	3day	4day
Limonene	148	102	-	-
ψ-terpinene	-	102	-	73
Linalool	870	4508	278	-
4-terpineol	-	660	-	-
vallero lactone	-	1620	-	-
α-terpineol	-	179	771	-
neryl isobutyrate	-	9939	-	-
nerol	202	597	-	-

5. 연속 생전환 공정용 bioreactor 시스템 정립

1) 고농도 배양 시스템에 의한 형질전환주로부터 limonene 생전환

가. Bioreactor에 의한 생전환시 limonene 공급량 결정

고농도 배양 시스템에 의해서 배양된 형질전환주를 새로운 최소배지 2L에 넣고 5L jar fermentor에서 생전환 반응시킬 때 limonene은 기체상태로 공급하여 주었다. Limonene은 대장균에 toxic하게 작용하기 때문에 limonene feeding을 달리하여 형질전환주의 균체에 반응시킬 때 생전환 된 물질의 종류와 생성량에 영향을 미칠 것이라 예상된다. 따라서 최적 limonene feeding 조건을 잡기 위해서 air flow rate을 0.25, 0.5 그리고 1 vvm로 각각 달리 공급하여 그에 따른 생전환 화합물을 분석하였다. Air flow rate을 달리하여 얻은 결과물은 GC/MS로 분석하였다. 주요 대사산물은 trans linalool oxide와 4-terpineol 그리고 fenchone이었다. 0.25 vvm의 조건에서 limonene을 feeding하였을 경우는 반응 36시간째부터 4-terpineol이 생성되었으며 시간이 지남에 따라 계속 증가하는 것을 볼 수 있고, 0.5 vvm은 24시간째부터 trans linalool oxide와 4-terpineol이 시간에 따라 증가하다가 108시간째에는 감소하였으며 84시간째에는 linalool oxide도 볼 수 있었다. 그리고 1vvm에서는 배양 48시간이 후에 linalool이 관찰되었으며 60시간째에는 4, 5-octanedion의 peak도 검출이 되었다(Fig. 2-13). GC/MS로 얻어진 peak값을 내부표준법에 의해 정량분석을 한 결과를 Fig. 2-14에 나타내었다. Standard는 limonene, trans linalool oxide, linalool oxide, linalool, 4-terpineol 그리고 α -terpineol에 대하여 농도에 대한 peak값으로부터 검량선을 작성한 것으로부터 정량분석을 하였다. Limonene으로부터 생전환된 물질의 양은 1 vvm의 조건으로 feeding하였을 때가 0.25, 0.5

vvm의 조건보다 더 많이 생성되었으며 반응 84시간째 1vvm에서는 trans linalool oxide는 72.489 mg/L, linalool은 104 mg/L, 4-terpineol은 87 mg/L였다. 반면 0.25 vvm은 trans linalool oxide는 15 mg/L, 4-terpineol은 48 mg/L였으며 0.5 vvm에서는 trans linalool oxide는 35 mg/L, 4-terpineol은 37 mg/L로 분석되었다. 이 결과로 생 전환 화합물의 양이 1vvm의 조건에서 더 많이 검출됨을 볼 수 있었다.

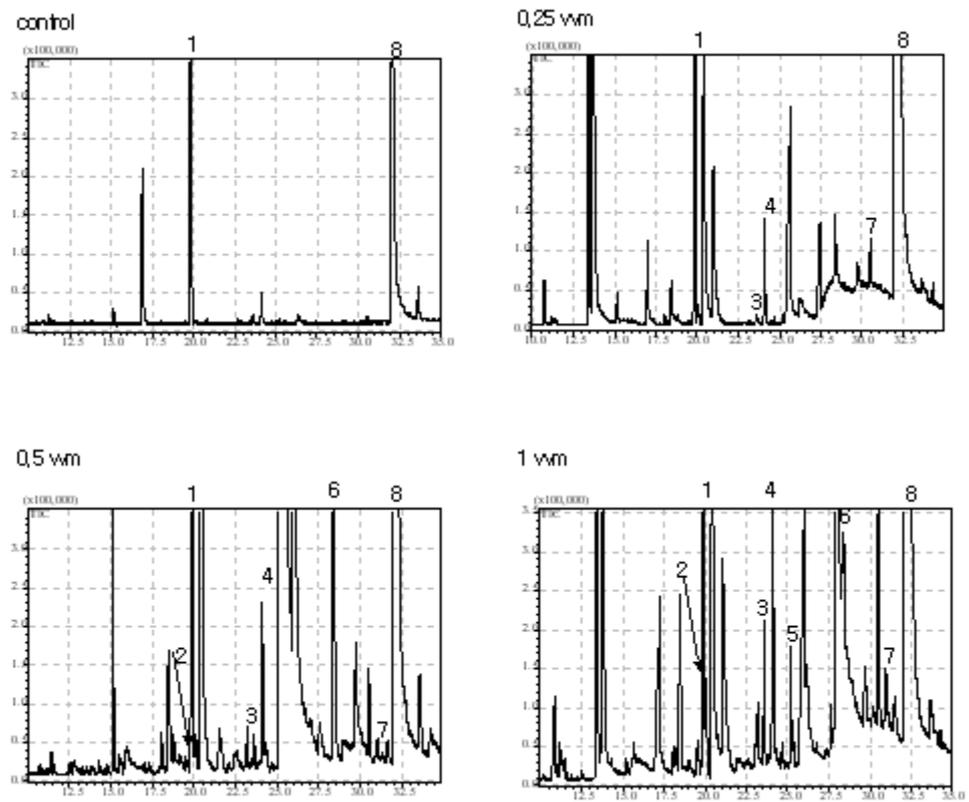


Figure 2-13. GC chromatograms of bioconversion products from limonene oil by limonene feeding at 0.25, 0.5 and 1vvm air supply.

1 : limonene, 2 : 1, 8-cineole, 3 : Trans linalool oxide, 4 : Fenchone, 5 : Linalool, 6 : 4, 5-Octanedion, 7 : 4-terpineol, 8 : Internal standard(ethyl maltol)

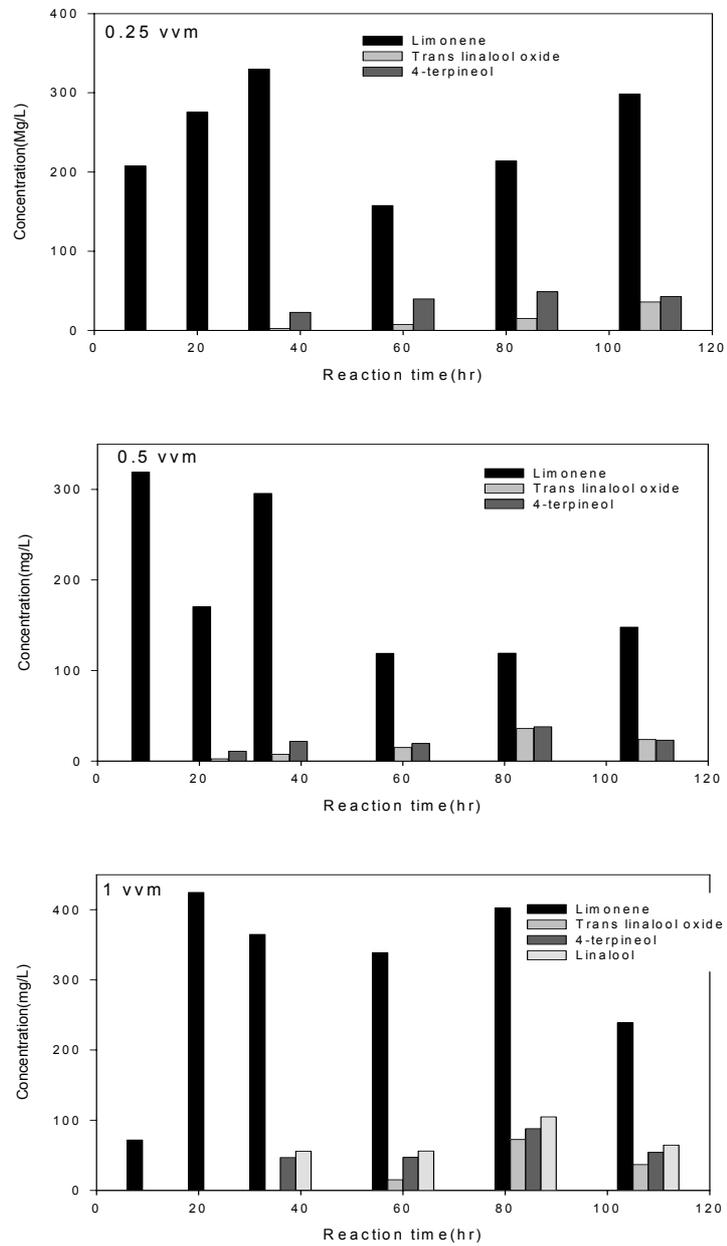


Figure 2-14. Bioconversion products change of limonene by *E. coli* at various limonene feeding condition with air supply of 0.25, 0.5 and 1vvm.

나. Limonene 공급 시 생육 시기에 따른 생전환 화합물의 분석

Limonene 공급량은 1vvm으로 하여 생전환 화합물을 생육 시기에 따라 분석하였다. 그리고 반응조로부터 빠져나온 기체는 EtOH(-4℃)을 통과시켜 기체와 함께 빠져나온 생전환 화합물을 일차적으로 포집시킨 후 -40℃로 맞춰놓은 ether에 2차적 포집을 시켰다. 각 반응된 배양액을 시간별로 추출하여 GC/MS로 분석하여 Table 22에 RT, RI값과 peak값을 정리하였다. 각 시간대별로 분석된 결과를 보면 반응 36시간째부터 trans linalool oxide, linalool oxide, linalool, 4-terpineol 그리고 α -terpineol이 검출되었으며 trans linalool oxide는 반응시간이 지남에 따라 계속 증가하였고, 108 시간째에서는 trans linalool oxide, linalool oxide, linalool, α -terpineol의 물질이 가장 높음을 볼 수 있었다. 그리고 반응 84시간째에는 trans-p-Mentha-2, 8-dienol과 trans-p-2, 8-Menthadien-1-ol 의 peak이 검출되었으며 108시간에는 cis-p-Mentha-2, 8-dien-1-ol이 검출되었다. 그리고 검출된 물질의 정량분석을 Fig. 15에 대조구와 함께 정리하였고 GC 그래프는 Fig. 16, 17에 나타내었다. 108시간째 trans linalool oxide는 145 mg/L, linalool은 86 mg/L, 4-terpineol은 102 mg/L, α -terpineol은 미량이지만 6 mg/L로 가장 높은 값을 보였다. 대조구로는 형질 전환체를 접종하지 않은 것으로 다른 조건은 모두 동일하게 하여 비교하였다. 대조구에서는 trans linalool oxide와 4-terpineol이 검출되었으며 이의 농도는 trans linalool oxide 44 mg/L, 4-terpineol은 55 mg/L로 형질 전환체를 접종하여 얻어진 것과 비교하여 보면 약 2배정도 형질 전환체 처리한 것이 높았으며 대조구에서는 볼 수 없었던 linalool과 α -terpineol 그리고 cis-p-Mentha-2, 8-dien-1-ol, trans-p-Mentha-2, 8-dienol과 trans-p-2, 8-Menthadien-1-ol도 볼 수 있었다. 한편 EtOH층과 ether층으로부터 회수된 물질을 GC/MS로 분석한 결과 limonene이 주 peak였으며 ether층에서는 β -terpinene이 검출되었고

그 양은 6.3 mg/L였다. Limonene으로부터 생전환 된 화합물을 Fig. 18에 도식화했다. 주로 4-terpineol과 trans linalool oxide는 생전환 반응 24시간째부터 생성되기 시작하였으며 fenchone은 48시간째부터, α -terpineol, linalool과 1, 8-terpine은 반응 36시간째부터 생성되었다. 그리고 linalool oxide는 84시간째와 108시간째에 생성되었으며 β -terpinene은 배양액에는 84시간째에, ether층과 EtOH층에서는 배양 48째부터 생성됨을 볼 수 있었다. 또한 trans-p-Mentha-2, 8-dienol은 반응 84시간과 108시간째에서 볼 수 있었으며 trans-p-2, 8-Menthadien-1-ol은 84시간째에 cis-p-Mentha-2, 8-dien-1-ol은 108시간째에 생성됨을 볼 수 있었다.

Table 2-22. Analysis of bioconversion products in reactor, 1st collector, EtOH part and 2nd collector ether part.

A. reactor

Component	RT	RI	Peak area
Limonene	19.803	1019	9,516,187
1, 8-terpine	20.000	1022	912,613
Trans linalool oxide	23.087	1063	2,114,944
Fenchone	24.028	1076	3,629,566
Linalool	25.151	1091	2,281,149
1-decanol	25.501	1096	641,836
trans-p-Mentha-2,8-dienol	26.477	1109	692,902
cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	27.571	1124	500,264
4-terpineol	30.444	1162	3,093,985
α -terpineol	31.479	1176	153,752
Ethyl maltol	32.090	1185	171,364,783

B. EtOH part

	Peak area(%)	
	Limonene	ψ-terpinene
1day	208320589	38094
3day	303703797	

C. ether part

	Peak area(%)	
	Limonene	ψ-terpinene
1day	110,095,186	
2day	236,207,449	366,013
3day	201,894,694	81,584
4day	299,696,120	35,545
5day	239,186,545	32,392

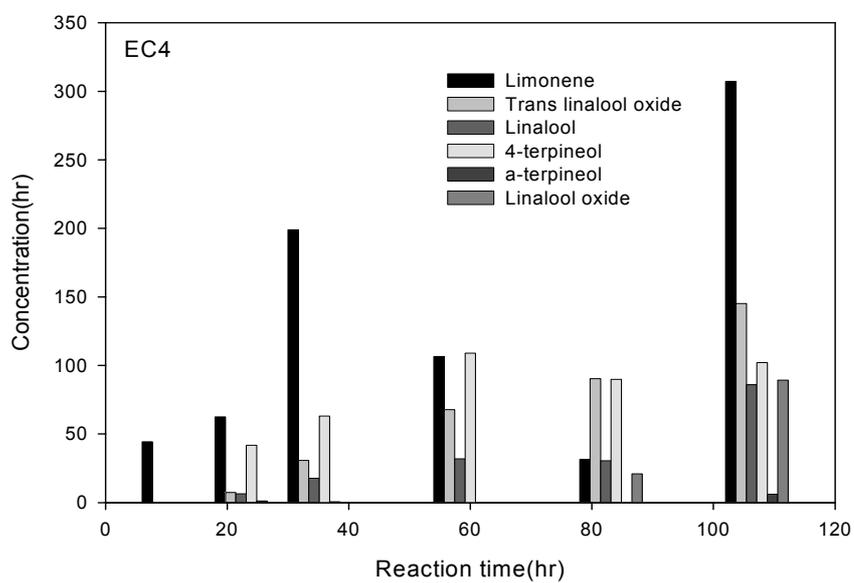
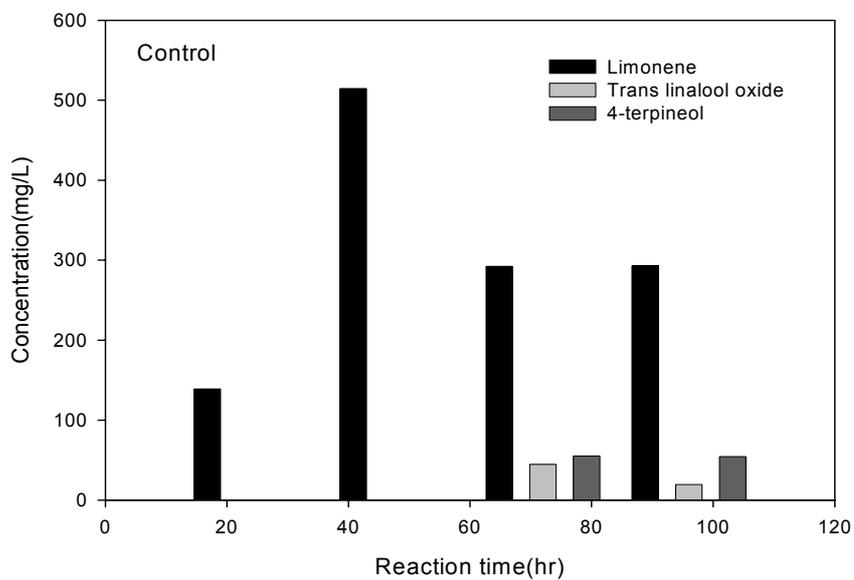


Figure 2-15. Comparison of bioconverted limonene products according to the reaction time by bar chart.

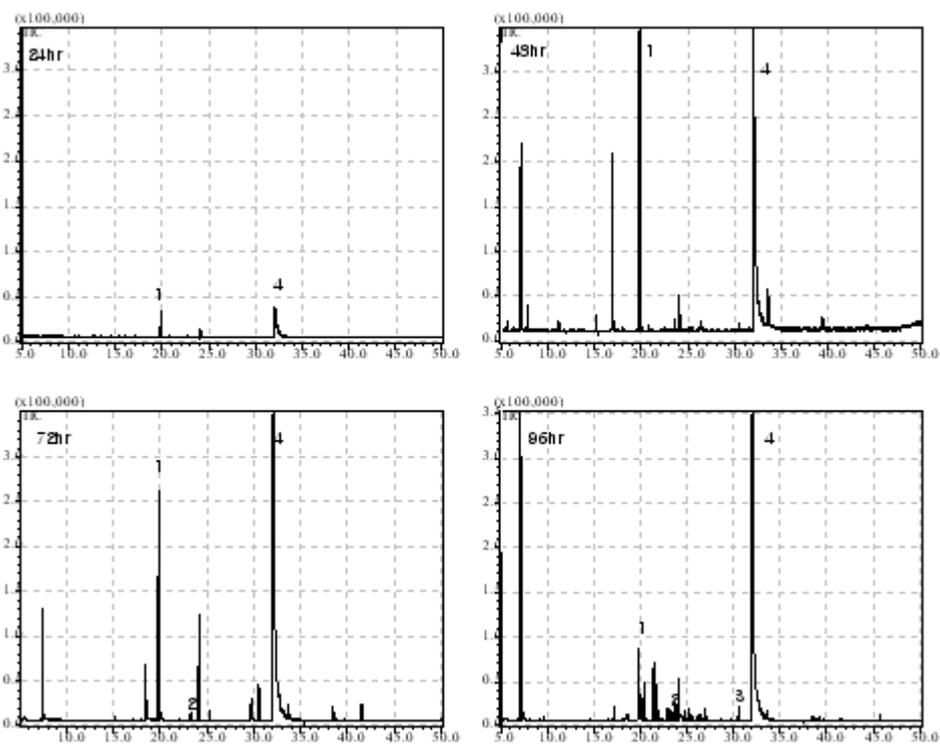


Figure 2-16. Control GC chromatograms of imonene. Limonene was fed with 1vvm air supply in 5J jar reactor filled with 3L of water without cell, *E. coli* EC4.

1 : Limonene, 2 : Trans linalool oxide, 3: 4-terpineol,
4 : Ethyl maltol

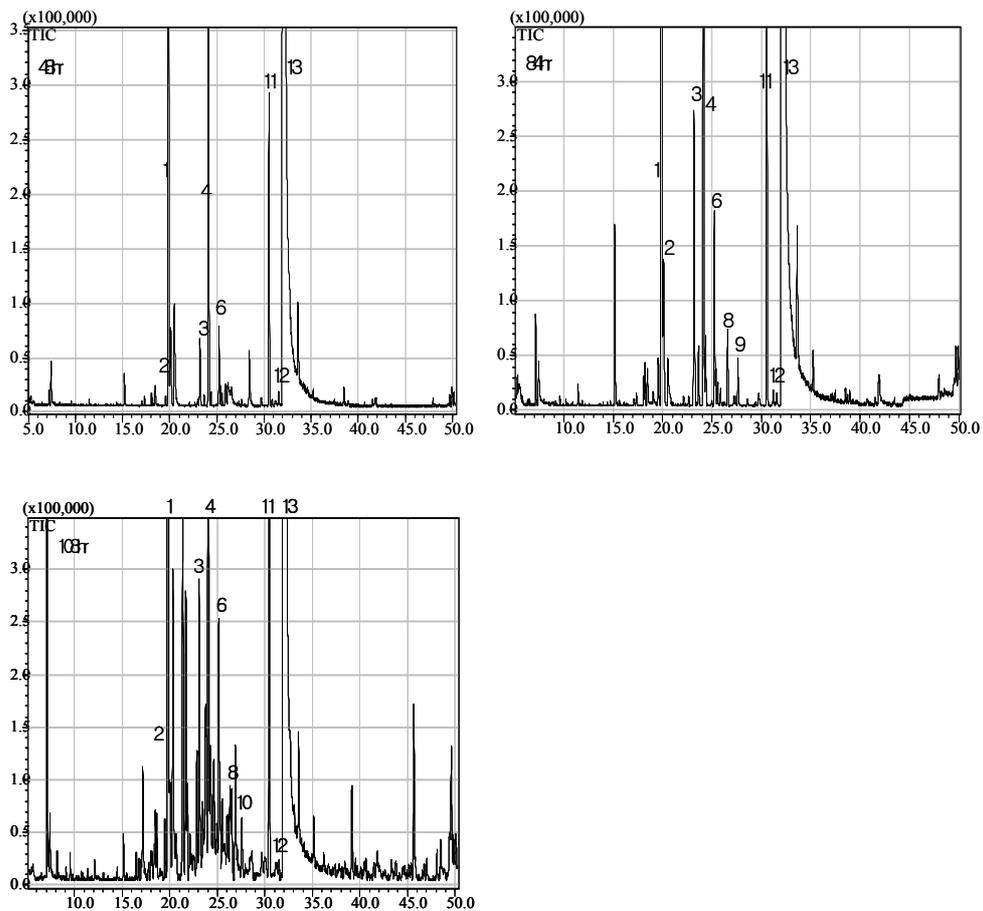


Figure 2-17. GC chromatograms of bioconversion products of limonene. Limonene was fed with 1vvm air supply in 5J jar reactor filled with 3L of cell, *E. coli* EC4 suspension.

1 : Limonene, 2 : 1, 8 -cineole, 3 : Trans linalool oxide, 4 : Fenchone 5 : Linalool oxide 6 : Linalool 7 : 3-Cyclopentene-1-acetaldehyde, 8 : Trans-p-Mentha-2,8-dienol, 9 : Trans-p-2,8-Nentandien-1-ol, 10 : Cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol 11 : 4-terpineol, 12 : α -terpineol 13 : Ethyl maltol

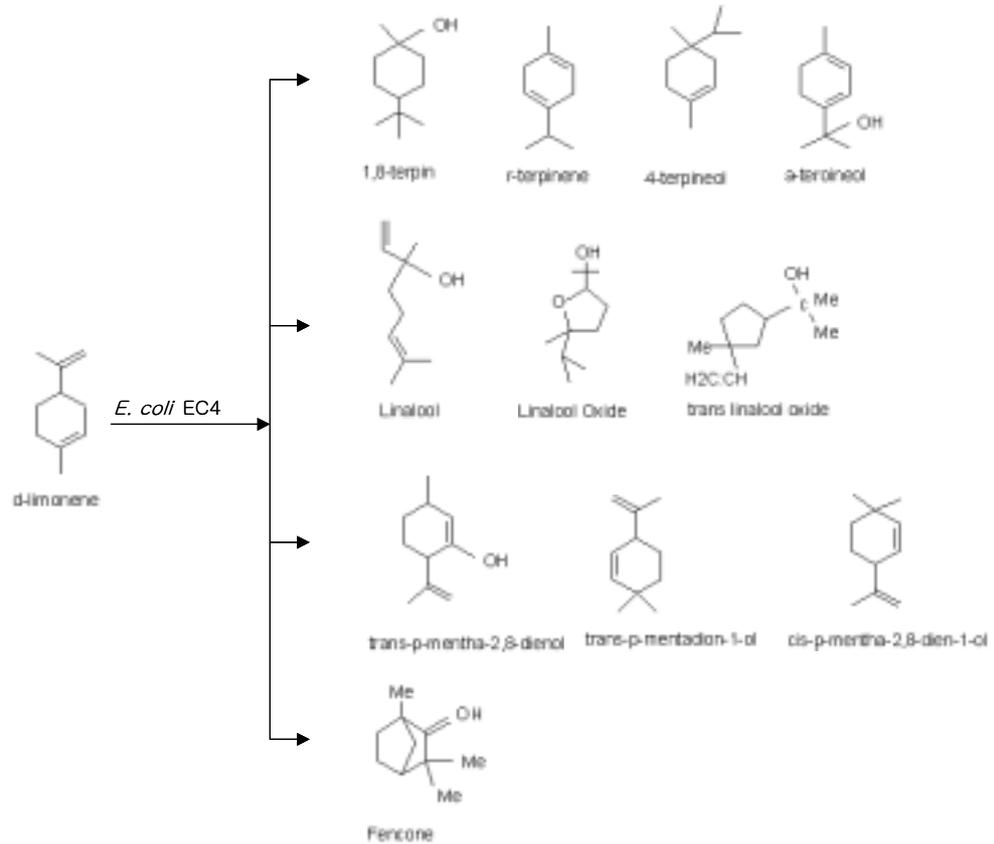


Figure 2-18. Possible bioconverted products of limonene by *E. coli* EC4.

2) 고농도 배양 시스템에 의한 형질전환주로부터 유자정유의 생전환

유자정유성분의 대사능을 지닌 모균주로부터 분리된 *E. coli* 형질전환주 EC4로부터 고농도 배양 시스템에 의하여 유자정유의 생전환을 유도하였다. 실험방법은 limonene으로부터 형질전환체를 생전환 시키는 것과 동일하게 수행하였으며, 대조구로는 같은 조건에서 형질전환체를 접종하지 않은 것으로 삼았

다.

유자정유의 주요화합물인 limonene 및 그밖의 terpene 화합물로부터 생전환시킨 대사산물을 분석하기 위하여 반응시간에 따른 GC/MS 분석결과를 비교 분석하여 Table 2-23에 정리하였다. 반응 초기 24시간째에서는 trans linalool oxide, Linalool oxide, 2, 6-octadien-1-ol, α -terpineol이 생성되었고 36시간째에서는 2, 6-octadien-1-ol대신 4-terpineol이 검출되었다. 반응시간이 지날수록 trans linalool oxide, Linalool oxide, 4-terpineol, α -terpineol의 값은 높아졌고 96시간째에 가장 높은 함량을 보여주었다(Fig. 2-20). 그 외에도 cis-cyclohexanol, Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one 그리고 β -terpineol도 검출됨을 볼 수 있었다. 얻어진 peak area값에 검량선에 대입하여 내부표준물질법에 의해서 정량분석을 하여 Fig. 2-21에 나타났다. 정량분석결과 거의 모든 생전환된 화합물들이 96시간대에 최대량을 보였다. Trans linalool oxide는 128 mg/L, linalool oxide는 116 mg/L, 4-terpineol은 298 mg/L이었으며 α -terpineol은 273 mg/L의 값을 보여주었다.

3) Limonene과 유자정유의 생전환시 발생하는 화합물의 비교

Limonene과 유자정유 대사능 형질전환주 *E. coli* EC4의 생전환 반응에서 얻어진 물질을 비교하였다(Fig. 2-22). Limonene을 feeding하여 생전환 시켜 얻어진 물질 중 생전환 반응 108시간째 trans linalool oxide가 145 mg/L로 가장 많이 검출이 되었으며 4-terpineol은 108 mg/L, linalool은 86 mg/L, linalool oxide는 89 mg/L 그리고 소량의 α -terpineol은 6 mg/L였다. 반면 유자정유로부터 생전환되어 얻어진 물질을 보면 limonene feeding에서 6 mg/L로 얻어진 α -terpineol은 유자정유에서는 273 mg/L로 높게 나와 차이를 보였으며 그 외 trans linalool oxide는 128 mg/L, linalool oxide는 116 mg/L 였으

며 4-terpineol은 limonene feeding에서 얻어진 것보다 3배정도 더 많은 298 mg/L로 차이가 났다. 이 결과를 보면 limonene 자체로 생전환 화합물을 유도하여 얻는 것보다는 유자정유로부터 생전환 화합물을 유도하였을 때 α -terpineol이 45배정도 더 생성됨을 볼 수 있었으며, 그 외 다른 향기물질도 비슷하거나 더 많이 얻을 수 있었다.

한편 초기의 유자정유 GC분석 시 limonene이 차지하는 area(%)가 전체 면적의 29%정도를 차지하는 반면 4-terpineol과 α -terpineol의 area(%)는 각각 0.01, 0.09%로 limonene에 비해 다른 물질은 상대적으로 아주 소량이 함유되어 있다(Fig. 2-19). 이에 초기 유자정유성분과 생전환 시킨 성분을 비교하여보면 형질전환체를 반응시켜 얻은 향기물질은 초기에는 limonene 함량이 생전환 된 물질보다 더 많지만 생전환 반응 시간이 지남에 따라서 limonene의 양은 상대적으로 줄어드는 반면에 생전환 물질이 limonene 양보다 4-terpineol은 약 3배, α -terpineol은 약 2.5배정도 더 많이 얻어짐을 알 수 있었다(Fig. 2-21).

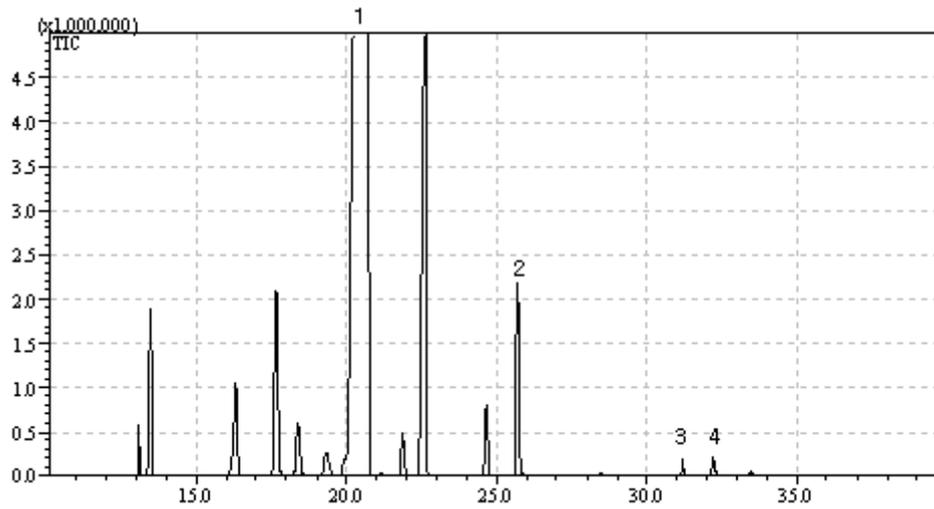
4) Limonene과 유자정유로부터 생전환 된 화합물의 관능평가

Limonene으로부터 생전환 된 화합물과 유자정유로부터 생전환 된 화합물로부터 선별된 관능평가 요원으로부터 관능평가를 실시하였다(Table 2-24). Limonene으로부터 유도된 화합물중 배양액으로부터 얻어진 것은 woody 향이 강하게 나타나며 쓴 향과 green 향이 섞여져 있는 복합적인 향을 냈다. 유자정유로부터 유도된 향의 관능결과 첫 느낌은 강하고 텅텅한 느낌의 독한 꽃향이 나며, 이 꽃은 라일락류의 향과 비슷하였다. 또한 끝향은 약간 상큼한 향과 그린향이 섞여있는 것으로 유자향과는 다른 독특한 향을 가지고 있으며 유자향과 비교하였을 때 좀더 고급스런 향의 느낌이 난다 평가하였다. Limonene과 유자정유로 생전환된 향을 비교하였을 때 보면 유자향으로부터 생전환된 향은

진한 꽃향과 우드 향이 섞여있는 것으로 평가된 반면 limonene은 woody한 향이 강하게 느껴지는 것으로 limonene으로부터 생전환 된 향보다는 유자정유로부터 얻어진 화합물의 향이 더 좋은 평가를 받았다.

5) Limonene과 유자정유로부터 생전환 된 화합물의 향균력 분석

Limonene과 유자 정유 원액의 향균력 및 생전환된 각각의 분획물에 대한 향균력 사진과 정성적 향균력의 분석 자료를 Fig. 2-23과 Table 2-24에 나타내었다. *E. coli*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* 그리고 *Salmonella typhimurium*에 대하여 향균력을 분석한 결과 limonene은 사용한 4 균주에 대하여 거의 항균 활성을 보이지 않으나, 유자 정유는 *E. coli*, *B. subtilis*에 대하여 강력한 향균력을 나타내고 있었다. 이들 정유로부터 생전환된 물질의 경우 limonene의 경우는 반응액 추출물에서 원래 limonene에서는 보이지 않던 향균력을 보이는 결과를 나타냈으며, 유자 정유의 경우는 반응물 추출액의 경우 고초균에 대해서는 매우 강력한 향균력을 나타내고 있다. 본 향균력 실험에서 특이할 만한 것은 limonene이 향균력을 나타낸다는 것은 이미 학계에 보고된 사실이나 실제의 향균력은 유자 정유에 비하여 매우 미약하다고 할 수 있으며, 유자로부터 추출한 정유의 경우 거의 10배 이상의 항균활성을 보이고 있어 유자 정유를 향균물질로 개발할 수도 있다는 점이다. 또한 유자 정유를 본 연구에서 사용한 *E. coli* EC4로 생전환 시킬 경우 원 물질에서는 보이지 않던 항균 활성이 생기는 생전환물이 생성되는 것으로 보아, 향균력을 갖는 물질의 개발에 대한 기초자료로도 활용이 가능할 것으로 판단된다.



Component	RT	RI	Peak area	Peak area(%)
Limonene	20.713	1031	346,370,073	25.94
Trans linalool oxide	25.712	1098	14,269,206	1.22
4-terpineol	31.187	1172	1,113,460	0.01
α -terpineol	32.220	1186	1,263,951	0.09

Figure 2-19. GC chromatogram and major compounds of citrus oil.

1 : Limonene, 2 : Linalool, 3 : 4-terpineol, 4 : α -terpineol

Table 2-23. Major bioconversion products of Citrus oil by *E. coli* EC4 after 96-hour reaction.

Component	RT	RI	Peak area
Limonene	20.106	1023	36,778,942
Trans linalool oxide	23.519	1069	16,166,133
Linalool oxide	24.71	1085	15,651,914
Pinocaveol	25.63	1097	169,957,384
Cyclohexanol	28.466	1136	2,056,716
Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one	28.947	1139	920,196
β-Terpineol	28.836	1141	6,504,632
4-terpineol	31.14	1172	82,872,441
α-terpineol	32.186	1186	61,642,234
Ethyl maltol	32.767	1194	156,769,210

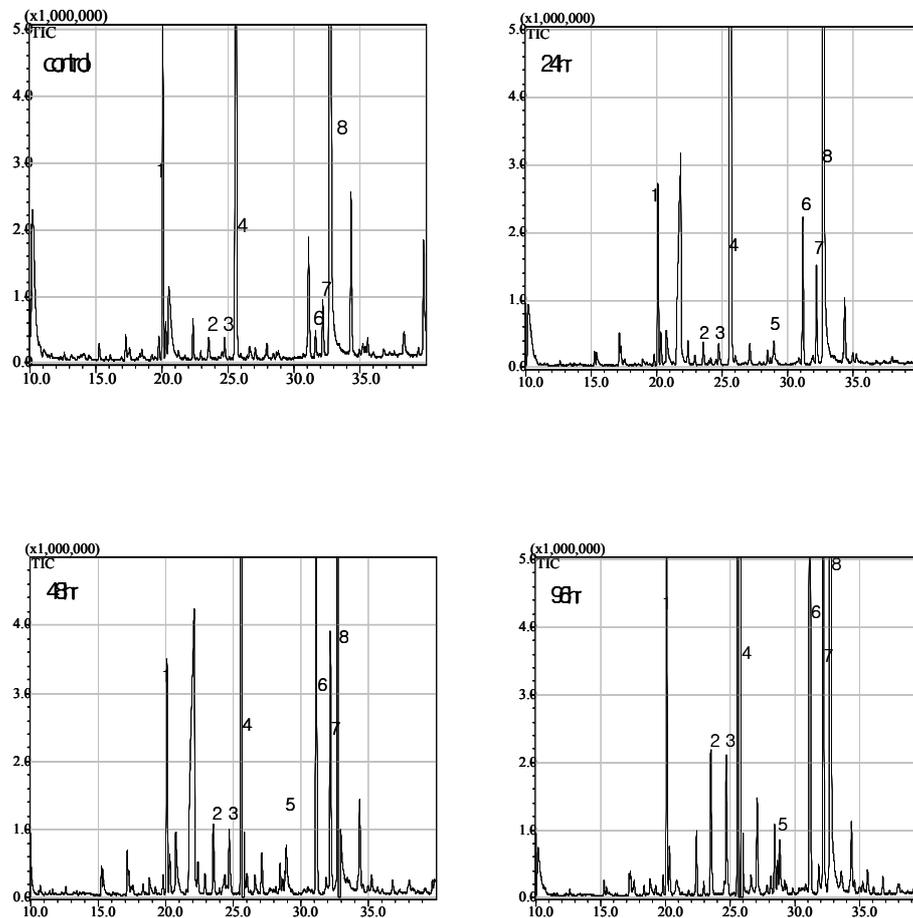


Figure 2-20. GC chromatograms of bioconversion products of *Citrus* oil by *E. coli* EC4 at 1vvm air supply.

1 : Limonene, 2 : Trans linalool oxide, 3 : Linalool oxide, 4 : Pinocaveol, 5 : β -terpineol, 6 : 4-terpineol, 7 : α -terpineol, 8 : Ethyl maltol

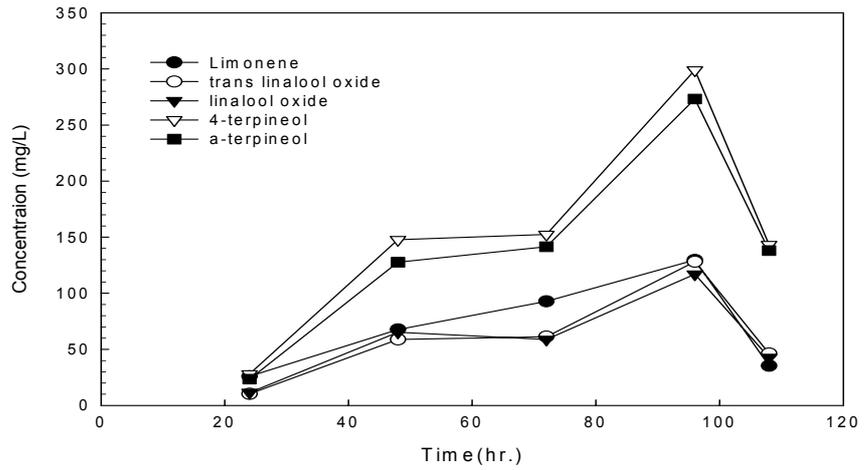
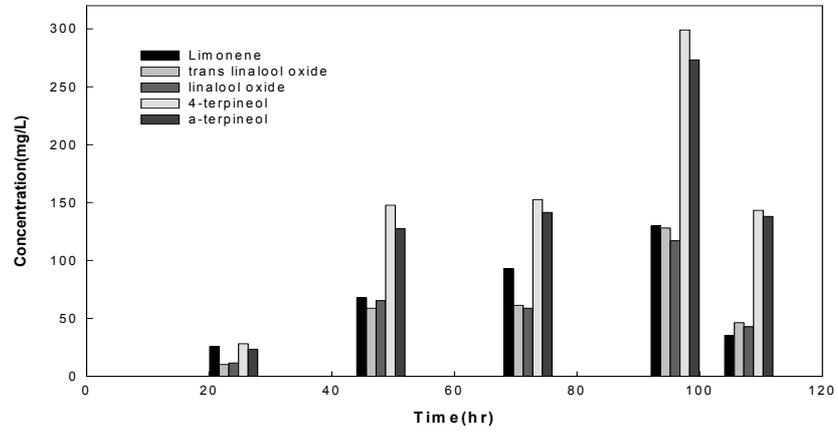


Figure 2-21. Change of bioconversion products of *Citrus* oil according to the reaction time.

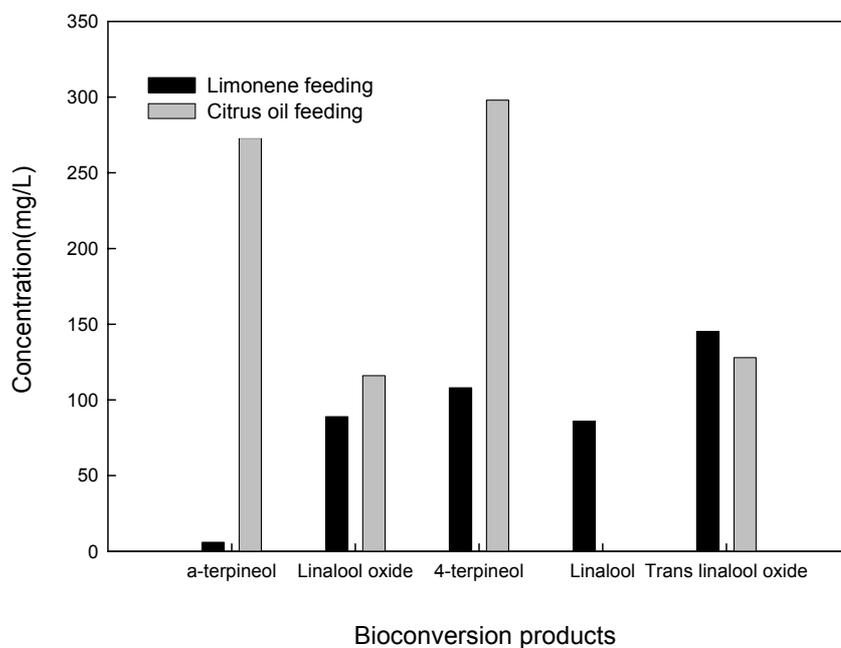


Figure 2-22. Comparison of major bioconversion products between limonene and Citrus oil.

Table 2-23. Sensory characteristics of bioconverted products from citrus oil and limonene.

		생전환 된 향의 특징
Citrus oil	broth extract	woody 향이 강하게 남. 쓴 향과 green 향이 섞여져 있는 복합적인 향
	EtOH extract	연한 꽃향기, 은은하며 상큼함. 유자씨 냄새가 남.
	ether extract	연한 citrus 계열 향
Limonene	broth extract	첫 느낌 : 강하고 텁텁한 느낌의 독한 꽃향이 나며, 이 꽃은 라일락류의 향과 비슷함. 끝 느낌 : 약간 상큼한 향과 그린향이 섞여 있는 것과 같은 유자향과는 다른 독특한 향, 좀더 고급스런 향의 느낌.
	EtOH extract	citrus 향이 많으며 레몬향이 남. 비타민C보다는 좀 덜 시큼한 냄새
	ether extract	약하게 나는 citrus 향

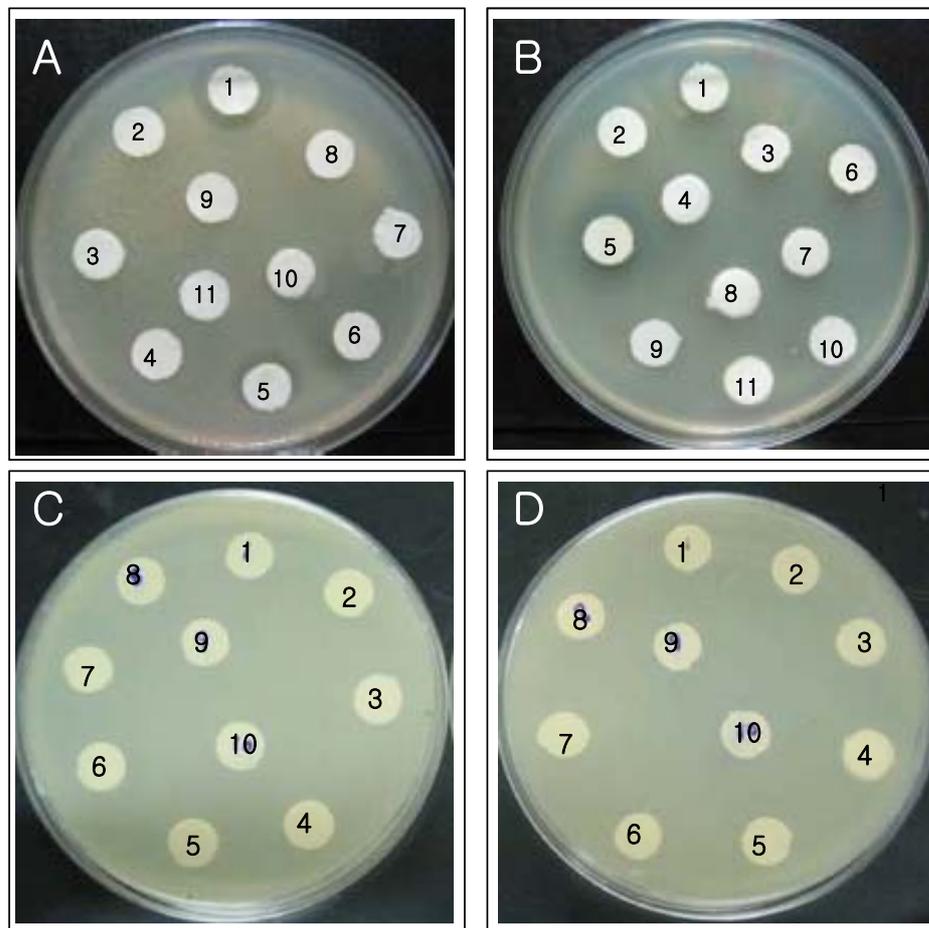


Figure 2-23. Photogram of antimicrobial activity of bioconverted products from citrus oil and limonene.

A : *E. coli*, B : *Bacillus subtilis*, C : *Micrococcus luteus*, D : *Salmonella typhimurium*.

①,②,③ is original citrus oil, 10-fold diluent and 100-fold diluent citrus oil, respectively. ④ is limonene, ⑤ and ⑥ is reaction extract of citrus oil and limonene ⑦ and ⑧ is ethanol fraction of citrus oil and limonene. ⑨ and ⑩ is ether fraction of citrus oil and limonene. ⑪ is ether as a control.

One μl of oil was used for antimicrobial activity test.

Table 2-24. Qualitative analysis of antimicrobial activity of bioconverted products from citrus oil and limonene against test strains.

		<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Monococcus luteus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
Citrus oil		+++ 4mm	+ 2mm	-	-
Citrus oil	Ether part	-	-	-	-
	EtOH part		+ 0.5mm	-	-
	Broth part	++ 1.5mm	+++ 4mm	-	-
Limonene	Ether part	-	-	-	-
	EtOH part	-	-	-	-
	Broth part	+++ 5mm	+ 1mm	-	-
Limonene		-	-	-	-

제 3 절 생전환 향기성분의 분석 및 안정성 평가

1. 서론

- 감귤은 우리나라 신선과실류 중에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 최근 과일생산 체계로 인하여 소득성이 낮아지면서 부가가치를 높일 수 있는 가공식품 개발이나 기능성 식품으로서의 가치를 개발하는데 관심이 높아지고 있다. 감귤의 식품가치를 보면 비타민 공급원, 식이섬유 공급원, 유기산 공급원 및 유리당 공급원으로서 시장에 공급되고 있으며 기능성 성분으로는 플라보노이드 성분이 함유되어 감기저항성, 항암, 동맥경화 예방 등의 약용으로도 가치가 높다는 보고 등이 최근 발표되고 있다. 감귤류 중 유자(citrus junos)는 레몬같이 신맛의 citrus fruit의 하나이다. 주로 한국에서는 유자차나 유자청으로 이용된다.
- 유자는 저장성이 낮아 11월에 수확하여 1개월 이내 밖에 저장할 수 없기 때문에 일본에서도 80-100g 전후의 5-7할 정도의 착색한 미숙과나 부피상태가 안된 양호한 것을 수확하여 저장하고 있다. 그러나 대부분의 바로 추출한 정유에서는 신선한 유자 향기성분을 함유하지만, 수시간 방치되면서 신선한 향기성분들의 소실이 발생한다. 유자향은 민감하여 향변질이 용이하고, off-flavor를 만들어 내므로, 이들 성분의 안정성은 시장의 잠재성에 중요한 역할을 한다. 유자 향기성분은 과육안에 있는 oil sac에서 유래되는데, 껍질에 0.02-0.03%, 과육으로 가공된 주스 내에는 0.002-0.005%로 껍질에 향기성분들이 더욱 다량으로 들어 있다.

- 현재 국내에서는 감귤 껍질을 일부 한약 및 사료로 이용하고 있는 정도이다. 이러한 감귤껍질을 그대로 폐기한다면 환경오염 요인이 될 수 있으므로, 공해문제의 해결이라는 점과 폐자원을 활용한다는 면에서 껍질 활용은 의미가 있다. 따라서, 신선과일로부터 주스를 생산할 때 발생하는 부산물인 과피의 효율적인 이용 방안이 필요하다. 이러한 이유로, 비용이 저렴하고, 널리 이용되는 terpene류이며, 식품이나 향료산업에 직접적으로 사용이 가능하며, 유자과피내에서 다량으로 존재하는 장점을 지닌 limonene을 이용한다. 이 성분을 미생물에 의해 생전환시킴으로 더욱 가치 있는 향기성분들을 창출해 낼 수 있다.

- 본 연구에서는 미생물을 이용하여 생전환 된 향기 성분을 분석하기 위한 배양액으로부터의 추출법 및 기기분석법을 확립하고, 이를 수행하여 생성된 향기 성분을 동정 및 정량한다. 확립된 추출, 농축 및 기기분석법을 사용하여 배양 조건에 따른 미생물로 생전환 된 향기 성분의 정성적·정량적 차이점을 분석하여 고찰한다. 이를 토대로 동정 및 정량된 유자의 향기 성분 중 주요 향기성분 8가지를 선정하여 이들의 저장용매와 온도에 따른 저장기간별 안정성을 평가하는 연구가 필요하다고 사료된다.

2. 연구수행방법

1) 생전환 향기 성분의 추출법 및 분석법 확립

가. 생전환 향기성분의 분석 조건

(1) 2002년 5월 sample : GC-MS, GC-O 이용

→ GC-MS condition

HP 5890 GC/5972 MSD system

Column : DB-5ms(30m × 0.25mm id × 0.25 μm film thickness)

temp program : 40°C(1min) → 5°C/min → 200°C(3min)

injector temp : 250°C

detector temp : 280°C

→ GC-O condition

varian 3800 GC equipped with a sniffing port

Column : DB-5ms(30m × 0.25mm id × 0.25 μm film thickness)

temp program : 40°C(1min) → 6°C/min → 200°C(3min)

injector temp : 230°C

detector temp : 250°C

split ratio : splitless

GC-O sniffing test sample : 6h control, 6h ECC3, 6h ECC4, 6h ECC6

48h control, 48h 3ECC3

2) 배양액으로부터 추출된 생전환 향기 성분의 동정 및 정량

가) GC, GC-MS, GC-olfactometry 등에 의해 유자 배양액의 향기성분을 분석, 동정하였다. 이때 사용한 GC-MS의 조건을 보면, HP 5890 GC/5972 MSD system 이었고, HP-innowax column을 썼으며, split ration 1:20 으로 수행하였다.

나) 1000ppm[in diethyl ether] ethyl maltol을 내부표준물질(Internal standard)로 이용하여 ethanol, limonene, γ -terpinene, linalool, 4-terpineol, alpha-terpineol 등의 유자배양액의 주요 향기성분을 normalization방법으로 정량하고자 하였으며, 정량을 위해 사용한 수식은 다음과 같았다.

normalized peak

$$\text{area(\%)} = \frac{\text{Peak area of component}}{\text{Peak area of ethyl maltol (internal standard)}} \times 100$$

다) Silica gel column chromatography를 이용하여 추출된 향기성분을 비극성의 pentane fraction과 극성의 ether fraction으로 분획한 후 각 fraction을 0.1ml 농축시켜 향기화합물을 GC-MS를 이용해 동정하였다. 이때, 사용한 GC-MS의 조건을 보면, HP 5890 GC/5972 MSD system이었고, HP-Innowax column이었으며, splitless로 수행하였다.

3) 생전환 향기성분의 분석 조건

가. GC, GC-MS에 의한 향기성분의 분석 및 내부표준물질(Internal standard)을 이용한 정량 실험

(1) 시료

Control 6h / 12h / 24h / 48h

Ecc3 6h / 12h / 24h / 48h

Ecc4 6h / 12h / 24h / 48h

Ecc6 6h / 12h / 24h / 48h

(2) 향기성분 추출 및 농축

- a. Sample 100 ml, 용매(재증류 diethyl ether) 100ml, Internal standard [1000ppm nonane in diethyl ether, 1000ppm ethyl maltol in diethyl ether (w/w)] 0.1ml씩 넣어 1시간 stirring
- b. 분별깔대기로 ether층을 분리한 후, 추출액(ether층)의 여분의 수분은 sodium sulfate로 제거
- c. N₂ gas로 추출액을 0.1ml까지 농축

(3) GC/MS분석

(가) 0.1ml로 농축시킨 추출액을 GC/MS로 분석

→ GC/MS condition

HP 5890 GC/5972 MSD system

Column : HP-Innowax (50m×0.2mm i.d.×0.4μm film thickness)

Temp program : 50°C (1min)→ 8°C/min→ 220°C(25min)

Injector temp : 250°C

Detector temp : 280°C

Split ratio : 1:20

(나) 유자배양액의 주요한 향미성분인 ethanol, limonene, α -terpinene, linanool, 4-terpineol, β -terpineol, thymol의 peak area를 normalized peak area(%)로 계산 (internal standard인 ethyl maltol의 peak area를 100%로 함)

$$\text{normalized peak area(\%)} = \frac{\text{Peak area of component}}{\text{Peak area of ethyl maltol(internal standard)}} \times 100$$

나. Silica Gel Column chromatography를 이용하여 추출, 분획된 향기성분의 동정

(1) 시료

Control, Ecc 3 12h, Ecc 4 12h, Ecc 6 24h, Ecc 3+4+6 48h

(2) 향기성분 추출 및 농축

- a. Sample 100ml , 용매(재증류 diethyl ether) 100ml 넣어 1시간 stirring
- b. 분별깔대기로 ether층을 분리한 후, 추출액(ether층)의 여분의 수분은 sodium sulfate로 제거
- c. N₂ gas로 추출액을 0.1ml까지 농축

(3) Silica Gel Column chromatography를 이용한 향기성분의 분획

- a. Wako gel Q-23 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)으로 Column을 packing (이때, 사용한 용매는 n-pentane)

- b. 0.1ml의 농축액을 column에 천천히 loading 후, 30분동안 conditioning
- c. *n*-pentane 50ml와 diethyl ether 50ml를 사용하여 농축액을 hydrocarbon
과 oxygenated compound fraction으로 각각 eluting
- d. 각 fraction을 N₂ gas로 추출액을 0.1ml까지 농축

(4) GC/MS분석

0.1ml로 농축액을 GC/MS로 분석

→ GC/MS condition

HP 5890 GC/5972 MSD system

Column : HP-Innowax (50m×0.2mm i.d.×0.4μm film thickness)

Temp program : 50°C (1min)→ 8°C/min→ 220°C (25min)

Injector temp : 250°C

Detector temp : 280°C

Splitless

4) 실험재료

가. 주요 유자향기 성분

: linalool oxide, terpinen-4-ol, thymol(Fluka Fine Chemicals, Switzerland)

limonene oxide, geraniol, nerol (Aldrich Chemical Co., USA)

linalool, α-terpineol (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)

나. Authentic flavor standards

위의 8가지 compounds

cis-& *trans*-dihydrocarvone, *cis*-& *trans*-carveol, citral (Aldrich

Chemical, Milwaukee, WI, USA).

다. 추출용매

ethanol, propylene glycol, glycerol (Aldrich Chemical Co., USA)

라. 실험방법

- a. 각각의 용매에 8가지 chemical을 1250ppm(w/w)이 되도록 녹인다.
- b. 1g씩 vial에 담아 25°C, 45°C incubator에서 저장하면서 매주마다 해당 vial을 꺼내어 pentane:water=7:2로 희석(125ppm, w/w)한 용액의 상1 μ l.
- c. 각 sample마다 3번씩 GC와 GC/MS로 반복 분석한다.

GC & GC/MS conditions

GC (HP 5890 Series II)

GC-MS (HP 5890 GC-HP 5972A MSD)

DB-5 column (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m film thickness)

Oven temp. 50°C(1min) \rightarrow 8°C/min \rightarrow 120°C \rightarrow 3°C/min \rightarrow 170°C \rightarrow 20°C/min \rightarrow 220
(3min)

Injector temp. 250°C

Detector temp. 280°C

splitless mode

Carrier gas (He, 0.8 ml/m)

마. 동정 및 정량

- 문헌상의 Retention indices(RIs)와 동종의 n-alkane(C7-C22)에 의한 RI와 비교하였고, GC-MS로부터 성분의 total ion chromatogram을 얻은 후, 표준품과 비교, Wiley library의 자료 또는 문헌상의 자료와 비교하여 확인하였다. 물질의 정량은 초기 peak area에 대한 저장 후 peak area의 %로 하였다.

3. 생전환 향기 성분의 분석

- 미생물을 이용하여 생전환 된 향기 성분을 분석한 결과, 주요 성분으로는 limonene, terpinen-4-ol, α -terpineol 등의 terpene 계통 화합물 및 그들의 산화 유도체가 주요 성분으로 동정되었다. 그러나, 일부 향활성성분들(odor-active compounds)이 미량으로 존재하여 질량분석기 등으로 정확한 동정이 이루어지지 않았다. 그리고, 대체적으로 citrus, fruity, yuzu-like 및 sweet한 향특성을 가지고 있는 성분들이 주를 이루었으나, 일부 나쁜 영향을 주는 쾌쾌한 장류 냄새, 나프탈렌 냄새, 한약 냄새 등의 이취(off-flavor) 성분들도 발견되었다. 따라서, 배양조건 및 기간에 따른 생전환 향기 성분의 차이는 이러한 다양한 향기 성분들의 정성 및 정량적 차이에 의해 결정되어질 것으로 여겨진다.

Table 3-1. Volatile compounds in 6hr cultures.

RT ^a	RI ^b	volatile compounds	odor description	peak area(%) ^c		
				ECC3	ECC4	ECC6
	727-729		citrus,grass	* ^d	*	*
	747		fresh			
	782		soy sauce	*		
4.33	813	unknown		1.24		
4.57	823	unknown	woody		19.78(*)	
4.66	827	unknown	grass,fresh		3.79(*)	37.76(*)
4.71	830	unknown		38.59		
	918-925		불쾌한 장류냄새		*** ^f	** ^e
	939		solvent			
8.63	982	unknown	chemical,pungent		0.6(*)	
8.86	990	1-decene		2.77	2.81	2.29
8.94	993	5-decene			0.65	
9.26	1004	unknown	citrus	1.41(*)	2.65(*)	
9.65	1018	unknown		0.96	2.05	
9.82	1024	p-cymene			1.82	
9.91	1027	limonene	fruity-sour	2.05(*)	2.86(*)	1.87(*)
10	1030	unknown			1.42	
10.8	1057	γ-terpinene				
12	1098	linalool	fruity-sweet	4.34	3.27(**)	5.88(*)
14.2	1175	terpinen-4-ol			0.63	0.87
14.6	1188	α-terpineol				1.09
14.7	1191	1-dodecene		7.94	7.84	6.75
	1194		한약냄새,woody		*	
14.9	1199	dodecane		1.03	1.05	0.9
16.4	1254	unknown				
17.4	1289	thymol	chemical,woody			
20.1	1392	1-tetradecene		11.79	12.28	10.03
20.3	1400	tetradecene		1.52	1.62	1.32
	1534		한약,쾌쾌한장류		*	**
24.9	1593	1-hexadecene	나프탈렌냄새	11.69	13.39(**)	11.31(***)
25.1	1600	hexadecane		1.95	2.03	1.52
29.2	>1700	1-octadecene		4.46	6.95	8.99
29.4	>1700	octadecane				1.28
30.3	>1700	eicosane			0.67	0.93
31.4	>1700	unknown				
33.2	>1700	unknown			1.1	4.08
35.6	>1700	tetracosane		2.24		

^a Retention timea

^b Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references

^c Peak area in total ion chromatogram of MS

^{d,e,f} *, **, *** : odorants detected by GC/O

relative intensity : *(weak), **(medium), ***(strong)

Table 3-2. Volatile compounds in 12hr cultures.

RT ^a	RI ^b	volatile compounds	peak area(%) ^c		
			ECC3	ECC4	ECC6
3.85	<800	unknown	1.25		
4.02	<800	unknown	0.93		
4.36	814	unknown			6.99
4.44	818	unknown	21.62	23.97	23.88
4.51	821	unknown			
5.15	849	<i>trans</i> -2-hexenal			
6.09	890	unknown		1.07	
8.54	979	phenol	1.68	1.52	
8.85	990	1-decene	2.01	1.45	
9.57	1015	α-terpinene	1.24	1.6	
9.76	1022	β-cymene	0.93		
9.9	1026	limonene	10.38	11.59	11.32
10.5	1047	unknown		0.99	
10.79	1057	γ-terpinene	2.75	2.52	2.39
11.66	1087	α-terpinolene	1.33	2.04	1.31
12	1098	linalool	30.63	30.76	41.64
12.1	1102	unknown	1.13		
14.2	1175	terpinen-4-ol	2.93	3.08	4.38
14.59	1188	α-terpineol	3.16	4.88	6.75
14.64	1190	1-dodecene	2.71		
17.41	1291	thymol	1.09	0.94	
18.02	1314	unknown			
20.03	1391	unknown	1.39		
24.87	1591	unknown	0.97		
29.21	>1700	1-octadecene			
29.87	>1700	unknown	1.68		
33.17	>1700	unknown	2.14	0.98	

^a Retention time

^b Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references

^c Peak area in total ion chromatogram of MS

Table 3-3. Volatile compounds in 24hr cultures.

RT ^a	RI ^b	volatile compounds	peak area(%) ^c		
			ECC3	ECC4	ECC6
3.87	<800	unknown			0.44
4.04	800	1-octene			0.36
4.14	805	hexanal			
4.37	815	unknown	0.51		0.96
4.51	821	unknown		24.33	0.46
4.54	822	unknown			1
4.7	829	unknown			
4.76	832	unknown	33.39		
5.23	852	<i>trans</i> -2-hexenal			
7.2	931	unknown	0.35		0.51
7.46	940	unknown		2.41	
7.79	952	unknown			1.18
8.27	969	unknown			0.44
8.55	979	phenol			1.23
8.61	981	(<i>z</i>)-4-decene	1.06		0.55
8.85	990	myrcene	2.72	2.19	4.21
8.94	993	4-decene		0.49	0.76
9.11	999	decane	0.4		0.68
9.19	1002	unknown		1.24	1.18
9.27	1005	unknown	1.73		
9.55	1014	α-terpinene			1.03
9.65	1018	unknown	1.32		
9.76	1022	β-cymene			0.73
9.81	1023	unknown	0.81		
9.91	1027	limonene	4.93	3.74	6.57
10	1030	unknown	1.09		
10.11	1034	unknown		0.85	
10.19	1036	unknown			1.52
10.48	1046	<i>trans</i> -β-ocimene			0.83
10.79	1057	γ-terpinene	1.08	0.71	1.49
11.64	1086	terpinolene	0.64		1.04
12	1098	linalool	10.91	9.84	9.39
13.28	1143	unknown		0.49	0.34

RT ^a	RI ^b	volatile compounds	peak area(%) ^c		
			ECC3	ECC4	ECC6
14.2	1175	terpinen-4-ol	1.31	1.06	1.54
14.58	1188	α-terpineol		1.14	2.15
14.66	1191	1-dodecene	9.39	6.16	8.95
14.89	1199	dodecane	1.09	0.79	1.13
15.39	1217	unknown		0.69	
16.2	1247	unknown			0.4
16.92	1273	unknown			1.59
17.39	1290	thymol			0.66
19.03	1353	unknown		9.85	
19.45	1369	unknown			0.49
20.05	1392	1-tetradecene	11.12	7.26	10.69
20.24	1399	tetradecane	1.46	0.93	1.44
22.31	1483	unknown		2.43	
24.87	1592	1-hexadecene	7.65	7.18	9.6
25.04	1599	hexadecane	0.87	0.98	1.11
25.85	1634	unknown		0.68	
28.67	>1700	unknown		0.82	
29.22	>1700	1-octadecene	1.54	4.21	6.04
29.37	>1700	octadecane			0.6
29.9	>1700	1-nonadecene			5.78
30.27	>1700	unknown			0.35
30.72	>1700	unknown		0.49	
32.59	>1700	unknown		0.53	
33.17	>1700	unknown		3.73	3.18
35.19	>1700	unknown			0.47

^a Retention time

^b Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references

^c Peak area in total ion chromatogram of MS

Table 3-4. Volatile compounds in 48hr cultures.

RT ^a	RT ^b	volatile compounds	odor description	peak area(%) ^c		
				ECC3	ECC4	ECC6
4	<800	hexanal	grass,fresh			
	<800		citrus,sour	* ^d		
4.39	816	unknown		9.41	14.08	7.03
4.55	823	unknown				1.98
	830		fresh	*		
	953		grass,woody	*		
8.58	980	phenol				1.82
8.83	989	β-myrcene				2.99
9.89	1026	limonene	fruity,sour	17.85(*)	10.13	12.52
10.78	1057	γ-terpinene		3.66	2.15	2.46
12.02	1099	linalool	fruity,sweet	55.72(*)	58.58	54.23
14.2	1175	terpinen-4-ol		4.78	5.56	5
14.57	1188	α-terpineol		6.51	7.62	7.23
	1194		한약냄새,woody	*		
	1210		citrus,sweet			
	1245		grass	*		
17.32	1288	1H-indole		2.08	1.89	1.74
	1324-1333		chemical,woody	*		
32.1	>1700	1-octadecene				3
33.5	>1700	1-octadecanol				

^a Retention time

^b Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references

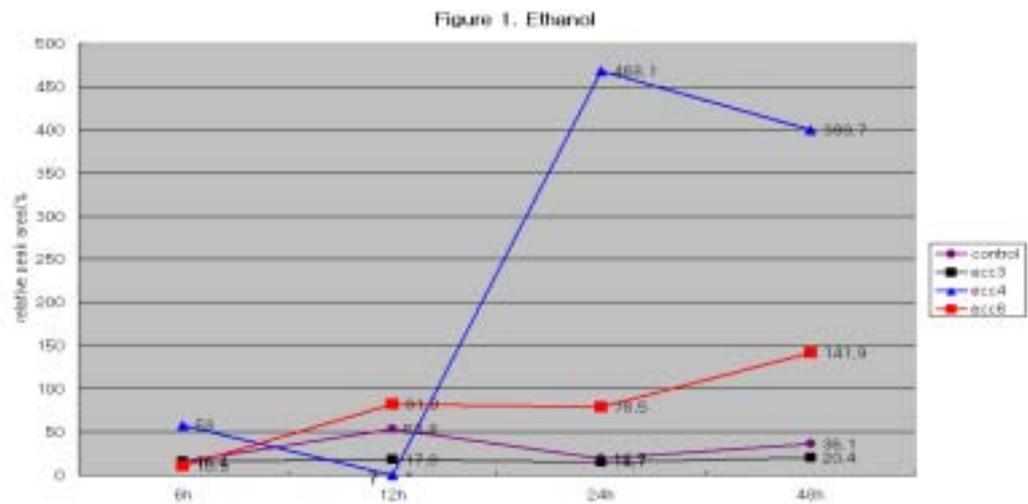
^c Peak area in total ion chromatogram of MS

^d * : odorants detected by GC/O

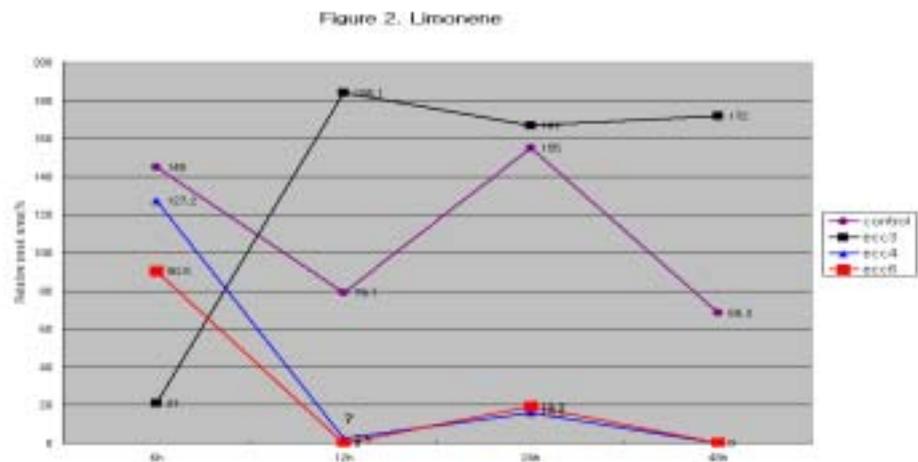
relative intensity : *(weak)

4. GC, GC-MS에 의한 향기성분의 분석 및 내부표준물질 (Internal standard)을 이용한 정량 실험

가. 미생물에 의한 유자의 생전환 된 향기 성분을 분석한 결과, 주요 향기 성분으로는 ethanol 및 limonene, γ -terpinene 등의 terpene 계통 화합물과 linalool, 4-terpineol, α -terpineol 등의 산화된 terpene 유도체가 주요 성분으로 동정되었다. 동정된 화합물들은 대체적으로 citrus, fruity, yuzu-like 및 sweet한 향 특성을 가지고 있는 성분들로서, internal standard [1000ppm ethyl maltol in diethyl ether(w/w)]를 이용하여 정량분석한 결과, 배양조건 및 배양기간에 따라 생전환 된 향기성분에는 정성 및 정량적 차이가 있었다. 미생물 배양조건, 배양기간에 따른 주요 향기화합물의 정성적, 정량적 차이는 다음의 표를 통해 그 차이를 명확히 구별할 수 있었다.

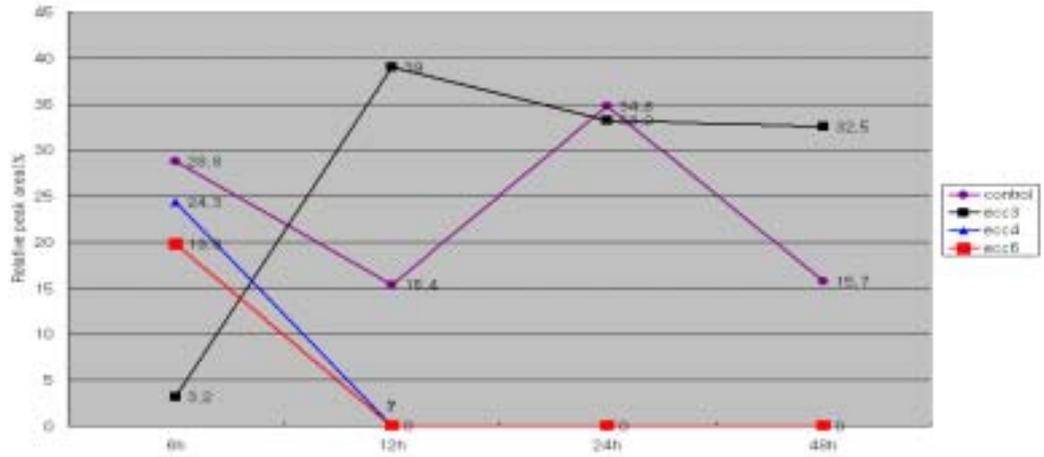


나. Figure 1을 보면, ethanol의 경우 Ecc4 24h, Ecc4 48h가 다른 시료들에 비해 ethanol의 함량이 상대적으로 많음을 볼 수 있으며, Ecc4라는 동일한 배양 조건에서 보면 24h일 때 ethanol의 함량이 가장 높고, 시간이 흐를수록 그 함량이 줄어드는 경향을 볼 수 있었다. 다른 시료들의 경우 ethanol의 함량에 있어서는 큰 차이나 증가추세는 없었다.



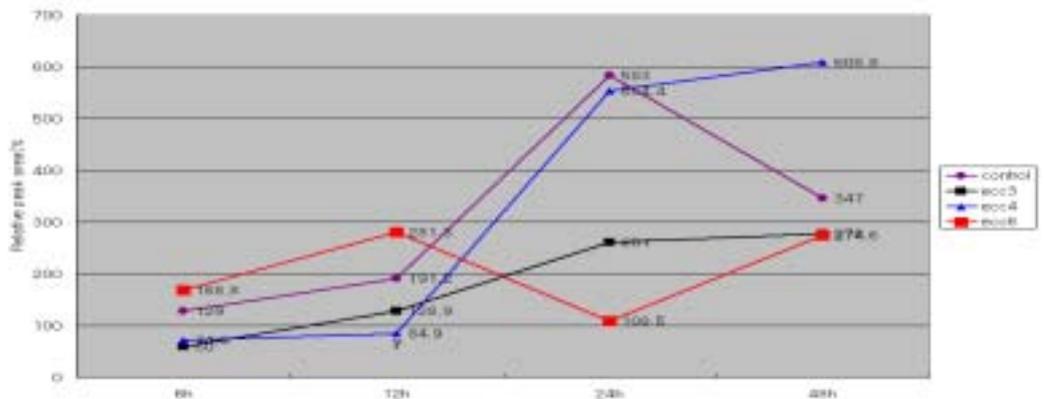
다. Figure 2를 보면, limonene의 상대적인 함량은 control, Ecc4, Ecc6에서는 배양시간이 길어짐에 따라 그 함량이 전체적으로 감소하는 경향을 보였다. 반면, Ecc6의 경우에는 배양시간이 길어지면서 limonene의 함량이 크게 증가하는 추세를 보였다.

Figure 3. Gamma-terpinene

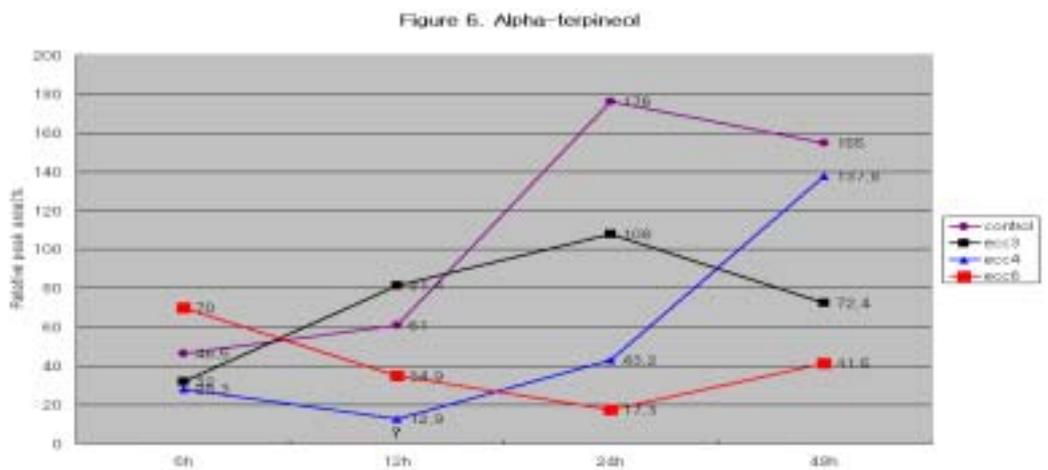
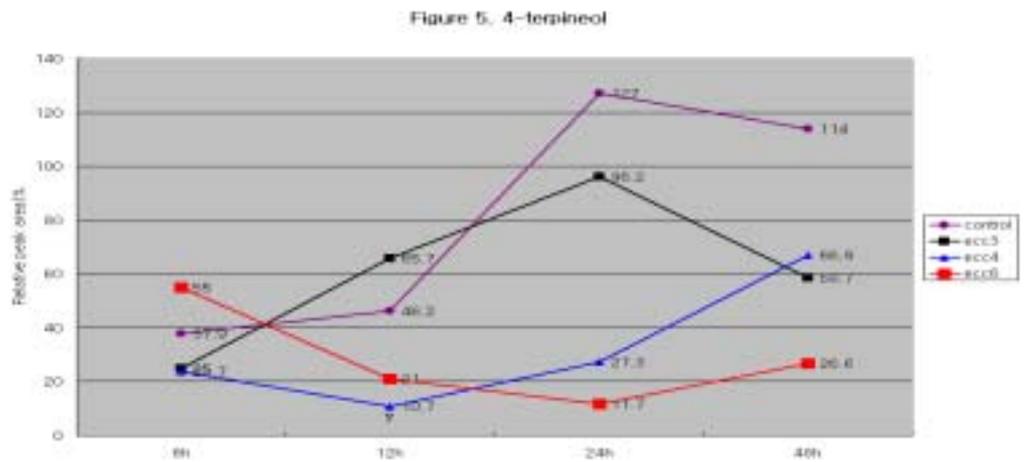


라. Figure 3의 γ -terpinene은 Ecc3의 경우, 미생물 배양시간이 길어짐에 따라 γ -terpinene의 상대적인 함량은 전체적으로 증가하는 추세를 보였으나, control, Ecc4, Ecc6은 배양시간이 길어질수록 감소하는 경향을 보였다. Figure 2의 limonene의 시료에 따른 상대적인 함량 변화를 나타내는 그래프와 비교해 볼 때, Figure 3의 γ -terpinene 그래프와 그래프 모양이 유사한 경향을 보였다.

Figure 4. Limonene

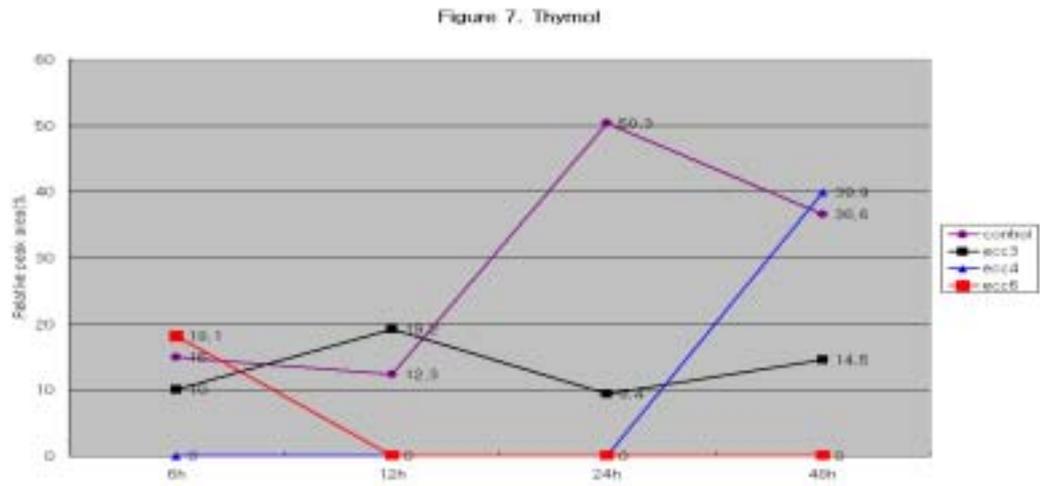


마. Figure 4의 linalool을 보면, control, Ecc3, Ecc4, Ecc6은 모두 배양시간 6h에 비해 48h일 때 linalool의 상대적인 함량이 증가하였으나, Ecc4가 배양시간이 길어짐에 따라 linalool 함량의 증가추세가 명확히 보였다.



바. Figure 5, 6의 4-terpineol과 α -terpineol의 경우에는 두 가지의 상대적인 함량 변화가 유사한 그래프 모양을 그렸으므로, 시료들의 배양조건 및 시간에

따라 4-terpineol과 α -terpineol은 그 변화가 동일한 경향으로 나타남을 알 수 있었다.



사. Figure 7의 thymol을 보면, Ecc4는 배양시간이 48h일 때, thymol의 함량이 크게 증가하는 경향을 보였다.

아. 1차년도 연구에서 동정되지 못한 oxidized terpene계통 화합물들은 유자에서 fruity, yuzu-like, fragrant, citrus한 향 특성을 주는 주요한 화합물로서 여겨졌다. 그리하여 이 화합물들의 정확한 동정을 위해서 2차년도에는 silica (Wako gel Q-23)를 이용한 column chromatography의 방법으로 추출된 배양액 성분들을 그들의 극성(polarity)에 따라 분획한 후 동정을 시도하였다. 그러나, 일부 화합물들의 분획이 본래의 의도대로 극성에 따라 완전하게 이루어지지 못했다. Silica gel column chromatography를 통해 극성에 따른 terpene계통 화합물들의 분리를 더 효율적으로 하기위해 용매의 종류, 용매의 elution 속도 등을 최적화할 필요가 있다.

자. 다음의 Table 1 ~Table 4는 각각의 배양조건(Control, Ecc3, Ecc4, Ecc6)에서 배양시간에 따른 휘발성화합물의 상대적인 함량을 보여준다. Table 1 ~ Table 4에서 제시된 30가지의 휘발성 화합물 중에, ethanol, limonene, α -terpinene, linalool, 4-terpineol, α -terpineol, thymol의 7가지 휘발성 화합물은 위의 Figure 1~7를 통해 상대적인 함량이 변화되는 경향을 그래프로 보였다.

Table 3-5. Volatile compounds in Control cultures.

RI ^{a)}	volatile compounds	Normalized Peak area (%) ^{b)} by GC-MS			
		6h	12h	24h	48h
<700	3-Methylpentane	670.65	427.62	829.40	11.41
<700	2-Ethyl-1,1-dimethyl-hydrazine	606.53	1675.29	1998.88	821.96
709	2,3-Dimethyl-1-butene	222.94	611.46	21.55	1.44
728	Cyclohexane	59.67	124.57	173.33	73.83
927	Ethanol	56.75	89.65	194.69	49.76
996	Decane	21.27	35.13	67.20	10.87
1105	Hexanal	0.38	0.29	17.79	3.83
1127	2-Methyl-2-butenal	6.24	12.48	7.27	0.14
1197	Dodecane	37.77	54.18	108.28	14.85
1233	Limonene	20.05	184.42	170.38	171.39
1255	2-Hexenal	0.47	2.14	- ^{c)}	0.05
1280	ψ-Terpinene	3.60	38.95	33.22	32.53
1321	■-Terpinene	1.36	3.41	5.15	1.75
1358	Hexanol	2.09	4.03	4.36	2.68
1398	Tetradecane	24.93	39.48	123.52	16.78
1447	Cyclotetradecane	5.17	7.46	7.15	4.97
1451	1-tetradecene	10.11	15.05	22.16	-
1476	cis-Linalool oxide	2.02	3.58	32.53	4.04
1495	2-Ethyl-1-hexanol	6.58	8.08	6.07	-
1552	Linalool	213.65	647.98	823.55	674.72
1599	1-Terpineol	6.75	13.37	194.38	13.89
1650	4-Terpineol	25.24	65.74	96.23	58.73
1665	1-Methyl-4-(1methylethenyl)-cyclohexanol	4.76	11.73	48.05	11.47
1736	■-Terpineol	31.46	81.44	107.71	72.42
1821	Nerol	3.23	2.84	2.95	0.24
1858	Hexanoic acid	14.47	30.84	17.52	27.64
1861	trans-Geraniol	0.18	0.09	0.49	0.19
2144	Globulol	3.87	7.49	9.22	5.65
2155	Viridiflorol	3.88	10.73	11.16	2.93
>2200	Thymol	16.78	43.44	21.81	20.13

^{a)} Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references

^{b)} Normalized peak area (%) =

$$\frac{\text{Peak area of component}}{\text{Peak area of ethyl maltol (internal standard)}} \times 100$$

^{c)} not detected

Table 3-6. Volatile compounds in ECC3 cultures.

RI ^{a)}	volatile compounds	Normalized Peak area (%) ^{b)} by GC-MS			
		6h	12h	24h	48h
<700	3-Methylpentane	178.76	21.92	182.43	29.47
<700	2-Ethyl-1,1-dimethyl-hydrazine	1673.77	743.41	941.92	849.77
709	2,3-Dimethyl-1-butene	153.31	- ^{c)}	403.36	-
728	Cyclohexane	173.13	131.44	72.54	157.63
927	Ethanol	44.70	133.88	35.98	126.46
996	Decane	28.07	12.27	23.79	14.63
1105	Hexanal	9.40	10.37	16.80	22.55
1127	2-Methyl-2-butenal	10.60	0.23	6.89	0.14
1197	Dodecane	43.82	22.56	38.47	25.33
1233	Limonene	145.51	78.92	156.24	69.04
1255	2-Hexenal	6.08	6.98	11.86	17.59
1280	¶-Terpinene	28.80	16.17	34.80	15.72
1321	▣-Terpinene	3.05	0.69	3.44	2.22
1358	Hexanol	3.59	4.79	7.08	10.98
1398	Tetradecane	31.01	24.45	32.02	29.83
1447	Cyclotetradecane	4.70	6.05	5.92	5.93
1451	1-tetradecene	12.54	-	10.25	-
1476	cis-Linalool oxide	1.88	3.70	4.47	5.27
1495	2-Ethyl-1-hexanol	6.71	1.39	5.43	-
1552	Linalool	350.16	477.24	1123.45	1214.57
1599	1-Terpineol	9.23	10.98	23.25	17.62
1650	4-Terpineol	37.93	46.16	127.01	114.33
1665	1-Methyl-4-(1methylethenyl)-cyclohexanol	6.84	7.09	21.97	21.22
1736	▣-Terpineol	46.51	60.96	175.51	154.63
1821	Nerol	1.16	2.67	7.10	-
1858	Hexanoic acid	0.81	0.90	1.23	1.54
1861	trans-Geraniol	14.21	11.74	28.23	24.91
2144	Globulol	3.03	5.03	12.94	8.38
2155	Viridiflorol	3.00	4.86	13.06	9.49
>2200	Thymol	133.45	18.96	50.28	36.59

^{a)} Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references

^{b)} Normalized peak area (%) =

$$\frac{\text{Peak area of component}}{\text{Peak area of ethyl maltol (internal standard)}} \times 100$$

^{c)} not detected

Table 3-7. Volatile compounds in ECC4 cultures.

RI ^{a)}	volatile compounds	Normalized Peak area (%) ^{b)} by GC-MS			
		6h	12h	24h	48h
<700	3-Methylpentane	4.03	– ^{c)}	–	–
<700	2-Ethyl-1,1-dimethyl-hydrazine	105.58	15.68	3.70	0.62
709	2,3-Dimethyl-1-butene	–	0.86	0.67	0.70
728	Cyclohexane	6.64	–	–	–
927	Ethanol	187.71	210.91	267.61	399.36
996	Decane	–	0.31	1.08	0.79
1105	Hexanal	8.09	0.19	1.16	3.02
1127	2-Methyl-2-butenal	3.02	0.16	0.77	0.27
1197	Dodecane	9.25	0.20	–	–
1233	Limonene	127.15	5.41	30.55	11.76
1255	2-Hexenal	0.55	–	0.62	1.23
1280	ψ-Terpinene	24.35	0.36	1.26	3.44
1321	μ-Terpinene	2.65	0.40	0.36	0.67
1358	Hexanol	2.44	1.14	0.20	1.05
1398	Tetradecane	9.12	1.34	–	–
1447	Cyclotetradecane	14.72	0.44	9.66	244.49
1451	1-Tetradecene	2.14	0.14	0.53	1.01
1476	cis-Linalool oxide	1.78	0.15	0.95	1.84
1495	2-Ethyl-1-hexanol	0.41	0.17	0.84	0.63
1552	Linalool	231.68	84.88	260.66	592.31
1599	1-Terpineol	23.67	0.07	5.70	1.78
1650	4-Terpineol	45.83	10.73	71.52	81.96
1665	1-Methyl-4-(1methylethenyl)-cyclohexanol	3.71	1.60	11.06	14.09
1736	π-Terpineol	39.23	12.87	53.19	131.23
1821	Nerol	0.67	–	–	1.54
1858	Hexanoic acid	42.36	23.17	27.48	96.64
1861	trans-Geraniol	1.15	0.10	1.34	0.35
2144	Globulol	0.92	0.93	1.29	15.01
2155	Viridiflorol	1.43	0.95	0.90	0.69
>2200	Thymol	0.47	0.13	0.40	63.12

^{a)} Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references ^{b)}

Normalized peak area (%) = $\frac{\text{Peak area of component}}{\text{Peak area of ethyl maltol (internal standard)}} \times 100$

^{c)} not detected

Table 3-8. Volatile compounds in ECC6 cultures.

RI ^{a)}	volatile compounds	Normalized Peak area (%) ^{b)} by GC-MS			
		6h	12h	24h	48h
<700	3-Methylpentane	17.81	– ^{c)}	–	–
<700	2-Ethyl-1,1-dimethyl -hydrazine	1370.67	92.59	127.56	1.22
709	2,3-Dimethyl-1-butene	–	–	–	–
728	Cyclohexane	–	0.40	0.33	0.36
927	Ethanol	32.36	51.34	78.47	141.91
996	Decane	16.05	–	–	–
1105	Hexanal	0.09	0.18	0.58	0.39
1127	2-Methyl-2-butenal	0.17	0.56	0.64	0.44
1197	Dodecane	24.24	–	–	–
1233	Limonene	90.11	4.79	19.25	0.29
1255	2-Hexenal	0.11	0.25	0.75	0.26
1280	ψ-Terpinene	19.77	0.28	0.42	1.04
1321	μ-Terpinene	0.98	1.32	0.34	0.73
1358	Hexanol	3.57	0.98	0.26	0.40
1398	Tetradecane	24.88	–	–	–
1447	Cyclotetradecane	8.84	116.97	91.05	3.72
1451	1-Tetradecene	0.09	0.66	0.26	0.42
1476	cis-Linalool oxide	3.29	1.74	0.44	0.33
1495	2-Ethyl-1-hexanol	0.27	0.66	0.84	0.43
1552	Linalool	522.70	163.37	91.89	274.59
1599	1-Terpineol	12.58	0.77	1.58	0.53
1650	4-Terpineol	59.27	24.84	25.34	26.59
1665	1-Methyl-4-(1methylethenyl)-cy clohexanol	9.58	5.13	1.03	7.10
1736	π-Terpineol	70.03	38.61	14.06	41.54
1821	Nerol	–	1.04	0.38	1.10
1858	Hexanoic acid	48.10	43.99	29.88	20.29
1861	trans-Geraniol	0.09	0.19	0.32	0.23
2144	Globulol	9.72	0.64	1.14	0.28
2155	Viridiflorol	13.16	0.44	1.23	0.11
>2200	Thymol	26.95	0.61	1.60	2.37

^{a)} Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references

^{b)} Normalized peak area (%) =

$$\frac{\text{Peak area of component}}{\text{Peak area of ethyl maltol (internal standard)}} \times 100$$

^{c)} not detected

5. Silica Gel Column chromatography를 이용하여 추출, 분획된 향기성분의 동정

- 2차년도는 Silica gel Column Chromatography를 이용해 유자의 주요 향기화합물을 극성에 따라 분획하였다.

Table 3-9에서 볼 수 있듯이, 비극성의 pentane fraction(100%)에서는 *n*-Tetradecane, *n*-Hexadecane, *n*-Octadecane 등의 hydrocarbon류와 β -Pinene, β -Myrcene, Limonene, Sabinene, γ -Terpinene, μ -Cymene 등의 terpene류 화합물들이 동정되었다. 극성의 ether fraction(100%)에서는 Table 3-10에 나와 있는 것과 같이, Linalool, α -Terpineol, β -Terpineol, Linalool oxide, Epoxylinalool, Murolol, Carveol, Spathulenol, Thymol, α -Cardinol, *T*-Murolol 등의 oxidized terpene 계 화합물이 동정되었다.

Table 3-11은 Ecc 6 24h와 Ecc 3+4+6 48h 시료에 대해 pentane : ether = 1 : 1로 섞은 용매로 eluting해서 얻은 fraction으로서, 이 두 시료는 배양시간이 긴 것을 고려하여 더 많은 생전환 향기성분들이 형성되었을 것이라 기대되었으므로 Control, Ecc 3 12h, Ecc 4 12h와는 달리 *n*-pentane과 ether의 중간 극성을 지니는 fraction을 한 번 더 수행하였다. 그 결과, 100% pentane fraction과 100% ether fraction에서 각각 동정된 화합물들이 pentane + ether fraction에서 동시에 동정이 되기도 하였지만, 특징적인 점은 Ecc 3+4+6 48h의 pentane + ether fraction에서는 *E*-Citral, Geranial의 성분이 동정이 되었다.

- Column Chromatography를 이용하여 유자의 향기화합물을 분획한 결과, 1차년도에 유자의 향기성분 중 동정이 되지 않았던, Linalool oxide, Epoxylinalool, Carveol, *E*-Citral, Geranial, α -Cardinol, *T*-Murolol 등의 성

분을 동정할 수 있었으며, Linalool oxide와 Carveol 의 경우 *cis*, *trans*의 두가지 isomer의 존재도 명확히 인식할 수 있었다. 그리하여 이러한 isomer 들이 유자의 향에 어느 정도의 향활성능력을 지니는지 확인하는 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

Table 3-9. Major volatile compounds in pentane fraction(100%) of each culture.

R.T. ^{a)}	Major volatile compounds	Culture				
		Control	Ecc 3 12h	Ecc 4 12h	Ecc 6 24h	Ecc 3+4+6 48h
12.47	1- β -Pinene	DT ^{b)}	- ^{c)}	-	-	-
12.91	β -Myrcene	DT	DT	-	-	-
13.17	<i>n</i> -Dodecane	-	-	DT	-	DT
13.71	Limonene	DT	DT	DT	DT	DT
13.92	Sabinene	DT	-	-	-	-
13.94	β -Phelladrene	-	-	DT	-	-
14.31	γ -Terpinene	DT	DT	DT	DT	-
14.56	bis[1-methylethyl] disulfide	-	-	-	DT	-
14.70	p -Cymene	DT	DT	-	DT	-
15.74	<i>n</i> -Tetradecane	DT	DT	DT	DT	DT
16.89	<i>n</i> -Pentadecane	-	-	-	DT	DT
18.72	<i>l</i> -Hexadecene	-	-	-	DT	-
18.01	<i>n</i> -Hexadecane	-	-	-	DT	DT
19.14	<i>n</i> -Heptadecane	-	-	-	-	DT
20.31	<i>n</i> -Octadecane	-	-	-	DT	-

^{a)} Retention Time on GC chromatogram

^{b)} Detected

^{c)} Not Detected

Table 3-10. Major volatile compounds in ether fraction(100%) of each culture.

R.T. ^{a)}	Major volatile compounds	Culture				
		Control	Ecc3 12h	Ecc4 12h	Ecc6 24h	Ecc3+4+6 48h
5.91	2-Ethyl-Hexanal	-	-	-	DT	-
11.88	3-Pentanol	-	DT ^{b)}	-	-	-
12.81	3-Penten-2-ol	-	DT	-	-	-
12.89	Myrcene	-	-	DT	-	DT
13.16	Dodecane	-	-	DT	-	-
13.25	α -terpinene	DT	- ^{c)}	DT	-	DT
13.49	α -Fenchen	-	DT	-	-	-
13.53	Limonene	DT	DT	DT	-	DT
13.74	α -Pinene	DT	-	-	-	-
13.78	β -Phelladrene	DT	DT	DT	DT	-
13.92	Sabinene	-	-	-	-	DT
13.99	<i>trans</i> - β -Ocimene	DT	DT	DT	-	DT
14.03	β -3-Carene	DT	-	-	-	-
14.04	<i>trans</i> - β -ocimene	DT	DT	DT	-	-
14.16	γ -Terpinene	DT	-	-	-	DT
14.52	bis[1-methylethyl] disulfide	-	-	DT	-	DT
14.66	p -Cymene	-	-	DT	-	-
14.75	α -Terpinolene	DT	-	-	-	DT
15.75	<i>n</i> -Tetradecane	-	-	DT	-	DT

^{a)} Retention Time on GC chromatogram

^{b)} Detected

^{c)} Not Detected

Table 3-11. Major volatile compounds in pentane + ether fraction(50:50) of each culture.

R.T. ^{a)}	Major volatile compounds	Culture	
		Ecc 6 24h	Ecc 3+4+6 48h
5.70	Butanal	-	DT
5.71	2-ethyl-Hexanal	-	DT
12.95	Myrcene	DT	DT
13.73	Limonene	DT	DT
13.92	β-4-Carene	-	DT
13.93	γ-Terpinene	DT	-
13.97	1,8-Cineole	-	DT
14.16	<i>trans</i> -β-Ocimene	-	DT
14.55	bis[1-methylethyl]-disulfide	DT	DT
14.87	α-Terpinolene	-	DT
15.76	<i>n</i> -Tetradecane	-	DT
17.18	<i>trans</i> -Limonene oxide	-	DT
17.48	Linalool	DT	DT
18.00	<i>n</i> -Hexadecane	-	DT
18.25	Camphor	DT	-
18.66	Terpinen-4-ol	DT	DT
18.77	Pinocarvone	DT	-
19.49	Bicyclo[3,1,1]hept-2-ene-2-carboxaldehyde	DT	-
19.58	<i>E</i> -Citral	-	DT
19.58	Geranial	-	DT
19.78	1,8-Menthadien-4-ol	-	DT
20.31	<i>n</i> -Octadecane	DT	DT
20.70	Carvone	-	DT
25.21	2,5-dimethyl-2,5-dihydro-2H-pyridine	-	DT
27.17	Spathulenol	DT	DT
27.38	Thymol	-	DT

^{a)} Retention Time on GC chromatogram

^{b)} Detected

^{c)} Not Detected

- 유자와 같은 citrus fruit의 향은 대부분 terpene 계통 화합물에 의해 그 향 특성이 특징 지워진다. 특히, oxygenated terpene류를 포함하여, alcohol, aldehyde, ketone, acid, ester로 구성된 산화된 화합물들은 유자에서 hydrocarbon이나 terpene계 화합물에 비해 상대적으로 적은 양을 차지하나,

유자의 특징적인 특성에는 매우 중요한 역할을 하므로 이와 같은 산화된 화합물의 동정을 위한 추출방법 개선 및 보완이 이루어졌다. 그리하여, 1차년도에는 유자배양액의 향기성분을 구성하는 화합물들을 극성에 따라 구분 없이 hydrocarbon, terpene계 화합물, 산화된 화합물 등을 모두 diethyl ether를 이용하여 추출하였는데, 향활성 능력이 크다고 여겨지는 산화된 화합물들은 극미량 존재하여 동정되지 않았으므로, 2차년도에는 Silica gel column chromatography를 이용하여 추출된 향기 성분을 비극성의 pentane fraction과 극성의 ether fraction으로 분획추출한 후, 농축하여 동정을 시도하였다. 그리하여 1차년도에 동정되지 않았던 linalool oxide, limonene oxide와 같은 oxygenated terpene계열 화합물들이 동정되었다.

6. 생전환 향기 성분의 안정성

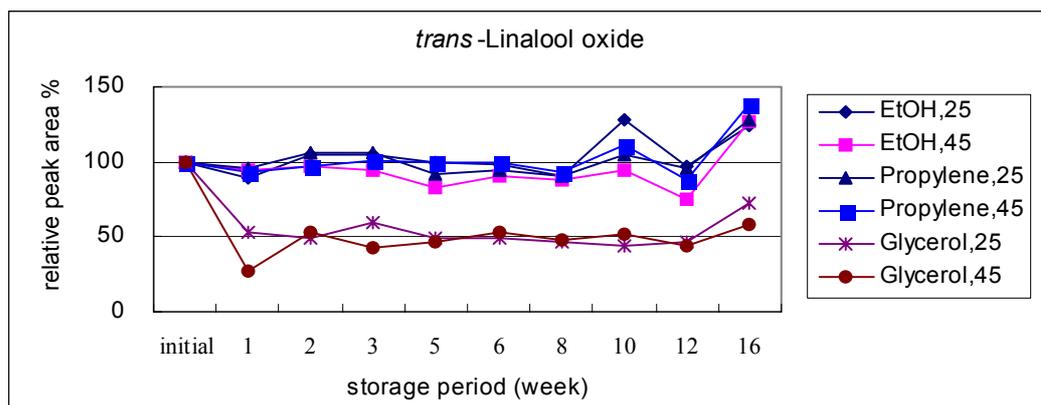


Figure 3-8. Changes of *trans*-linalool oxide during storage.

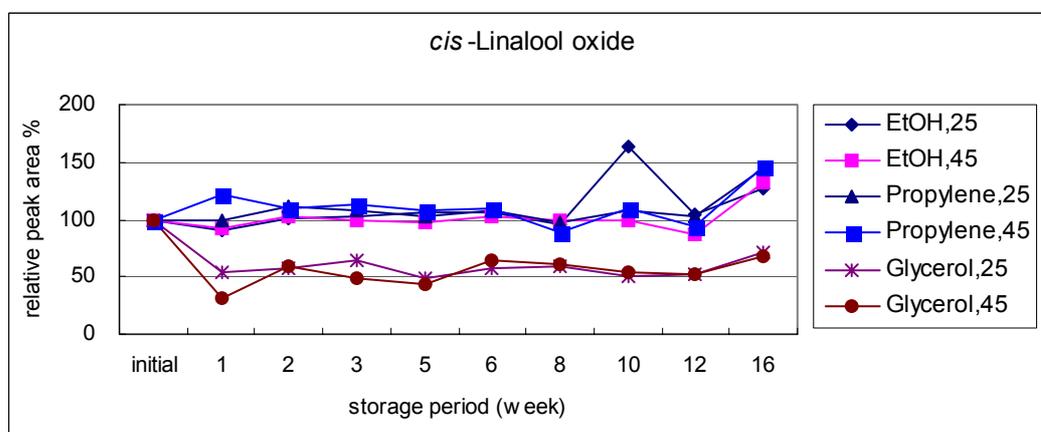


Figure 3-9. Changes of *cis*-linalool oxide during storage.

1) Fig. 3-8과 3-9에서 보듯이, linalool oxide는 매우 단향을 가지며, 향료산업에서 매우 중요한 성분이다. 본 실험에서 *cis*- and *trans*-linalool furanoxide는

16주 ethanol, pr-pylene glycol의 모든 온도 조건에서 바로 저장한 시점에 비해 20% 이상 증가하였으며, glycerol에서는 35% 이상 감소함 보였다.

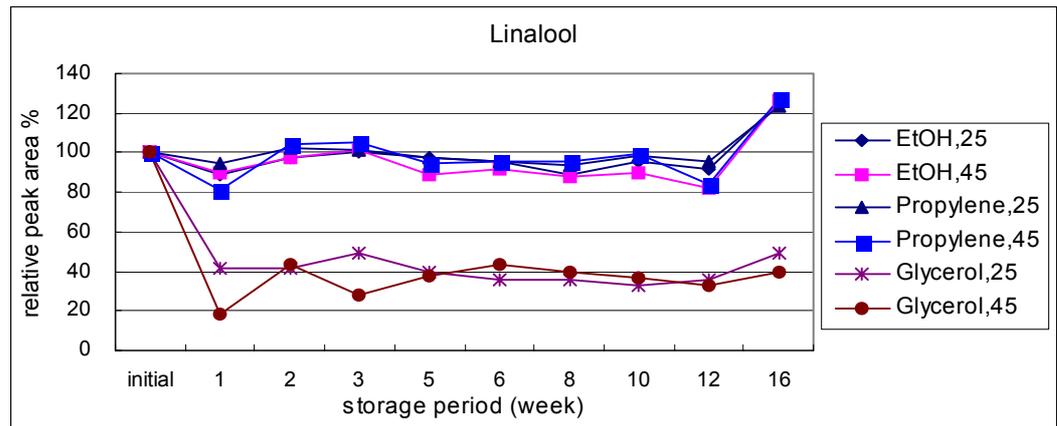


Figure 3-10. Changes of linalool during storage.

2) Fig. 3-10에서 보듯이, linalool 은 monoterpene alcohol이며, floral aroma를 가져, 토마토, 포도 및 와인, 망고, 레몬 oil, 라임 oil, 살구 등과 같은 식품의 중요한 향기성분의 하나이다. 기 연구 결과에 의하면 linalool은 4℃와 30℃에서 저장되는 동안에 α -terpineol과 1,8-terpine, geraniol, and nerol을 형성한다고 보고되었다. 본 실험의 결과, linalool은 glycerol보다 ethanol, propylene glycol에서 뚜렷이 더 안정하다.

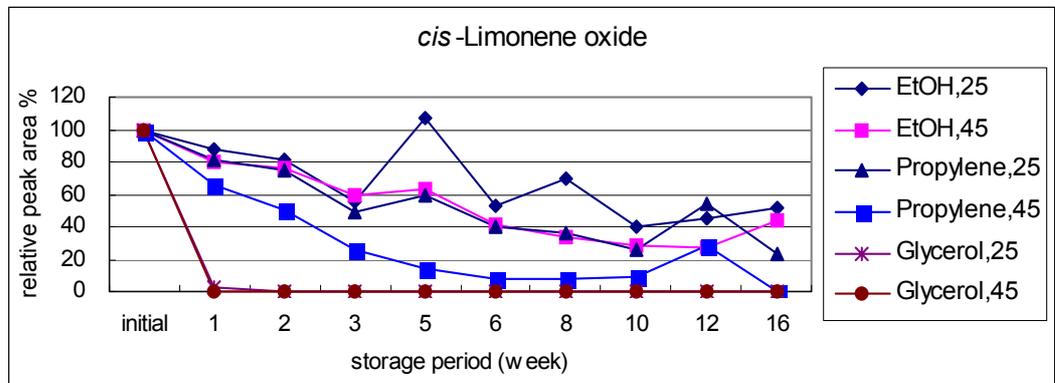


Figure 3-11. Changes of *cis*-limonene oxide during storage.

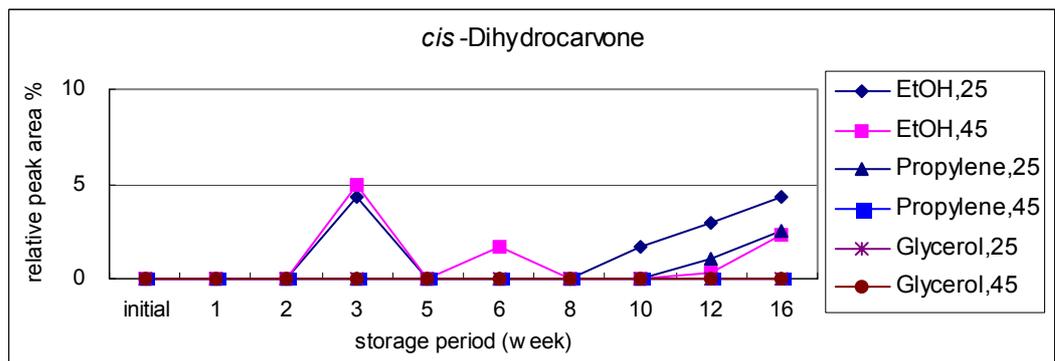


Figure 3-12. Changes of *cis*-dihydrocarvone during storage.

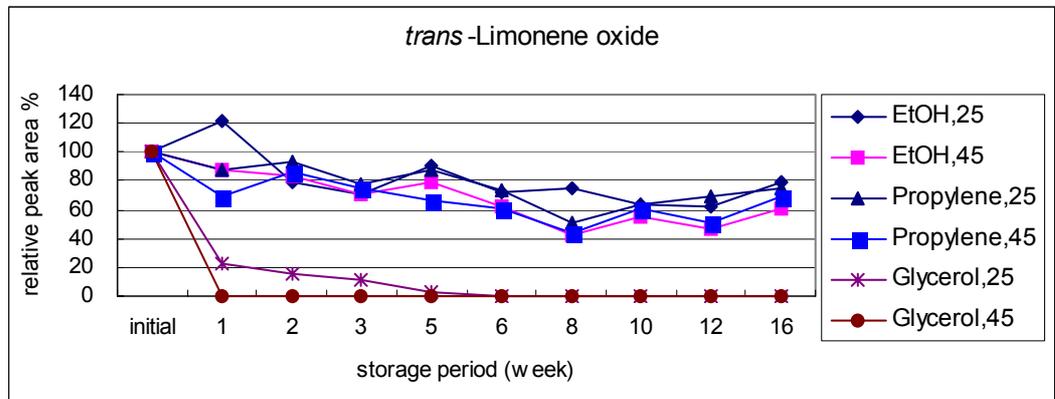


Figure 3-13. Changes of *trans*-limonene oxide during storage.

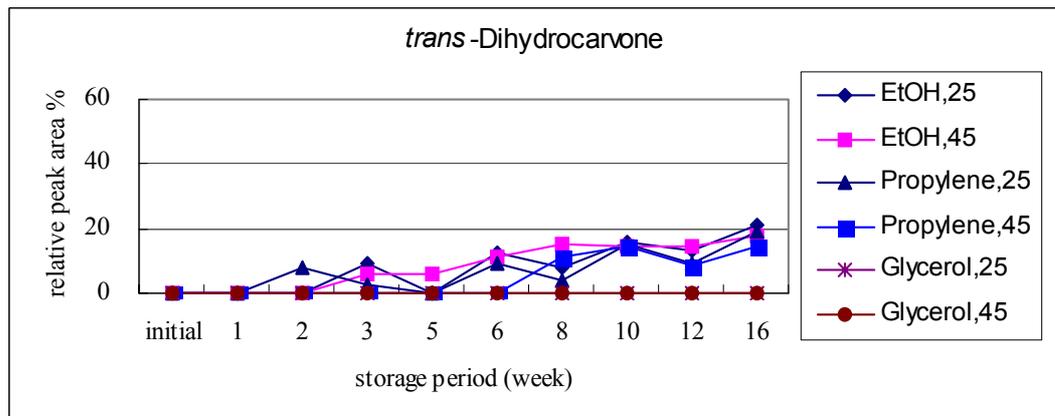


Fig 3-14. Changes of *trans*-dihydrocarvone during storage.

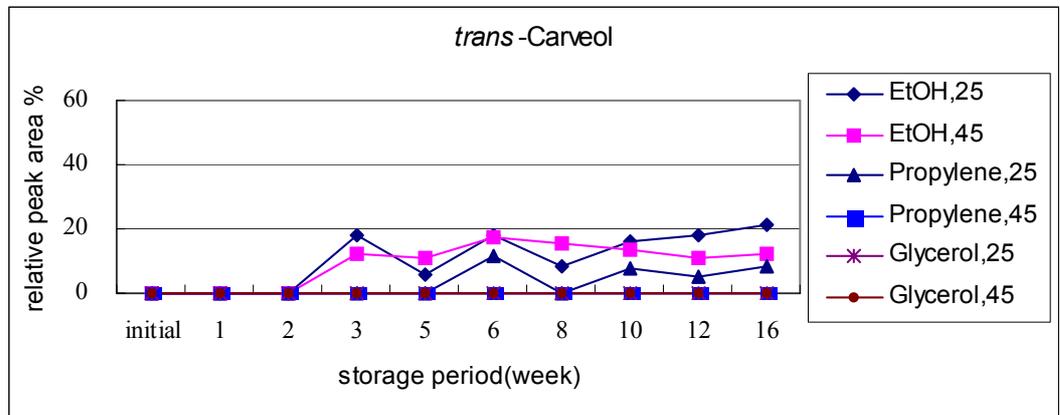


Figure 3-15. Changes of *trans*-carveol during storage.

3) Fig 3-11 ~ 3-15는 *cis*- and *trans*-limonene oxide와 *cis*- and *trans*-dihydrocarvone, *trans*-carveol의 저장기간별 변화를 보여준다. limonene oxide가 저장기간동안 dihydrocarvone과 carveol로 산화와 재배열을 통해 변화되었다. *cis*- and *trans*-limonene oxide는 16주에는 ethanol과 propylene glycol의 모든 온도조건에서 20%이상 감소하였고, glycerol에서는 40%이상 감소하였고, 다른 향기성분들에 비하여 안정성이 크게 떨어지는 성분임을 확인할 수 있었다. 용매 glycerol에서는 *trans*-dihydrocarvone만 생성되고, *cis*-dihydrocarvone은 생성되지 않았다.

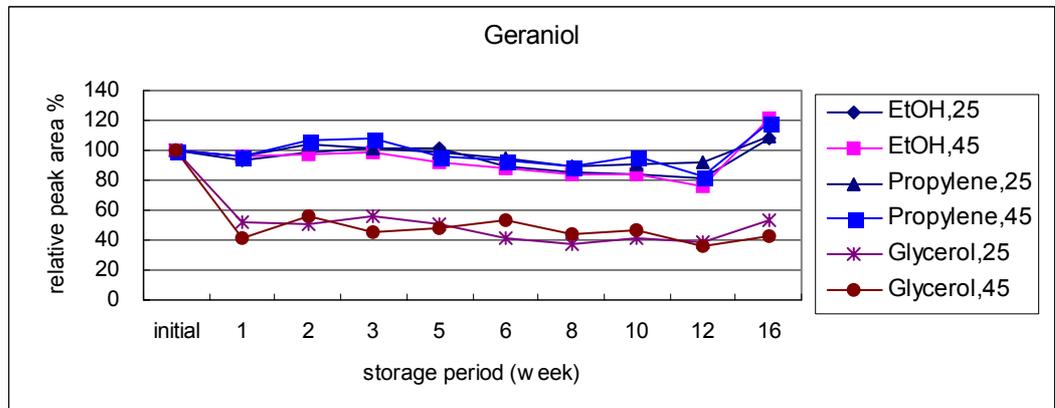


Figure 3-16. Changes of geraniol during storage.

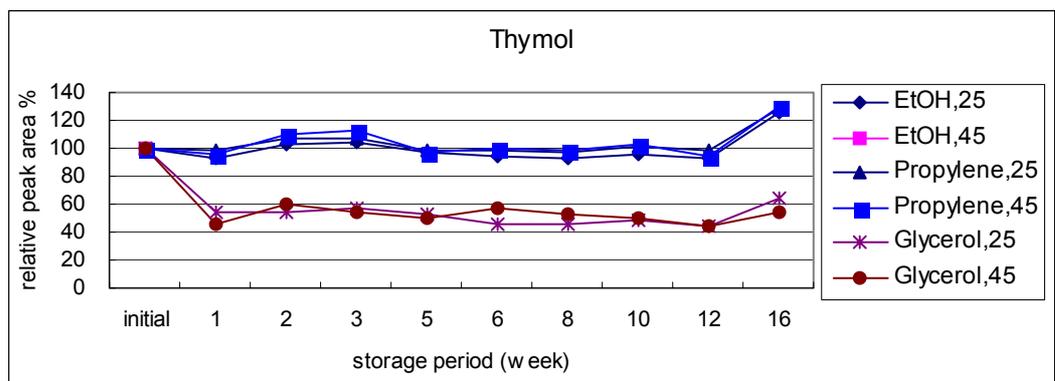


Figure 3-17. Changes of thymol during storage.

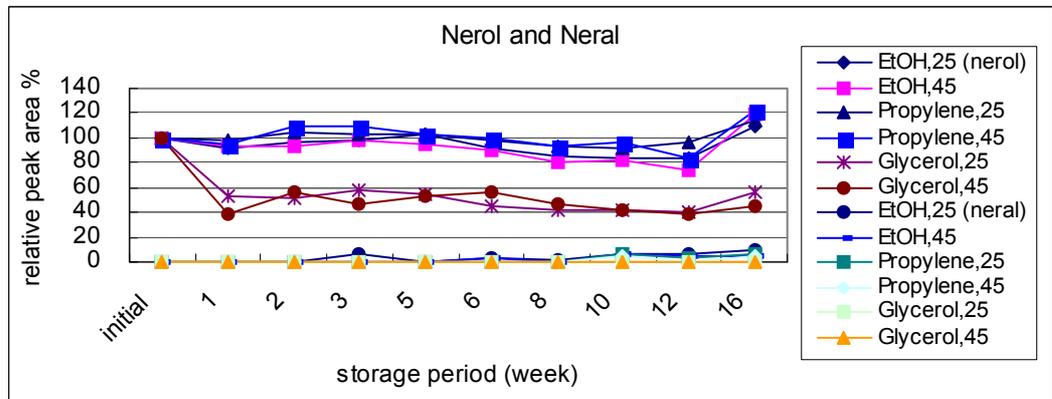


Figure 3-18. Changes of nerol and neral during storage.

4) Fig. 18은 Nerol의 산화로 neral이 생성됨을 보여준다. Nerol은 glycerol보다 ethanol, propylene glycol에서 더 안정하다. Ethanol, propylene glycol의 모든 온도조건에서 증가하였으나, glycerol에서만 확인되지 않았다.

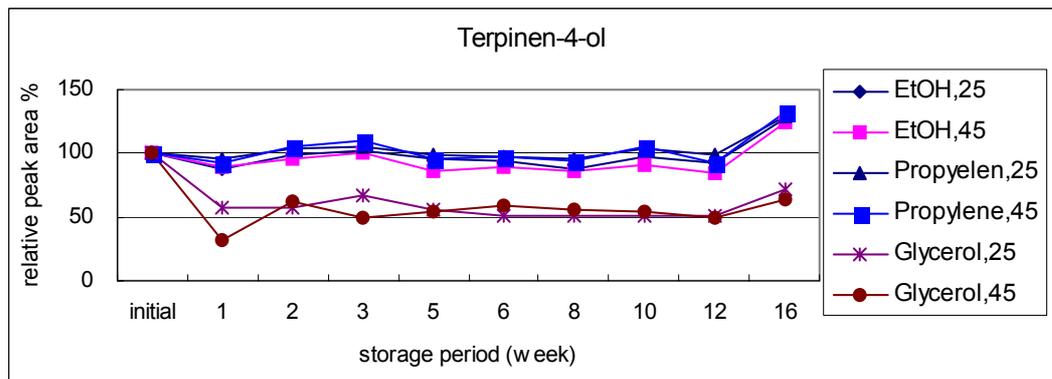


Figure 3-19. Changes of terpinen-4-ol during storage.

5) Terpinen-4-ol은 warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor를 가지는 성분으로, Fig. 19를 통해 보듯이 ethanol, propylene glycol에서는 10% 내외의 증감을 보이지만, glycerol에서는 50% 가량의 감소를 보여, 이 용매에서의 안정성이 뚜렷이 낮음을 확인할 수 있다.

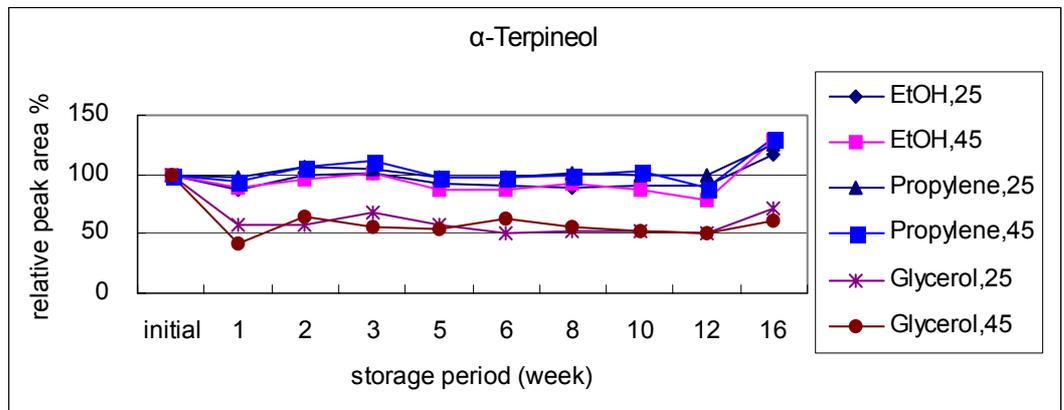


Figure 3-20. Changes of α-Terpineol during storage.

6) α-Terpineol은 감귤같이, 달면서 느끼한 향을 가지는 성분이다. 많은 과실에서 좋은 향기성분에 기여하지만, 저장하면서 발생하는 off-flavor(terpentine-like, stale, musty and pungent)에도 관여하므로, 전반적인 품질 평가의 기준이 되는 성분이기도 하다. 이 성분도 위의 terpinen-4-ol과 비슷한 변화경향을 보인다.

Table 3-12~3-17은 저장온도와 용매에 따른 저장기간별 변화 정량값을 보여 준다.

Table 3-12. Compositional changes in citrus flavor compounds in ethanol solvent stored at 25°C for 16 weeks.

No.	RI ^a	Possible compounds	P.A.(%) ^b										ID ^c
			initial	1	2	3	5	6	8	10	12	16	
1	1073	<i>trans</i> -linalool oxide	100	89.38	104.42	104.42	100.00	98.23	91.15	128.32	97.35	123.89	RI, MS, Co-injection
2	1087	<i>cis</i> -linalool oxide	100	90.60	100.90	102.83	105.70	106.60	95.28	164.15	103.77	126.42	RI, MS, Co-injection
3	1097	linalool	100	89.10	97.44	100.00	97.44	95.19	89.10	95.19	91.99	125.32	RI, MS, Co-injection
4	1137	<i>cis</i> -limonene oxide	100	88.30	80.85	55.32	107.45	53.19	70.21	40.43	44.68	51.06	RI, MS, Co-injection
5	1142	<i>trans</i> -limonene oxide	100	122.07	79.31	70.34	90.34	71.72	75.17	64.14	62.76	79.31	RI, MS, Co-injection
6	1177	terpinen-4-ol	100	88.04	99.69	101.53	95.40	93.87	88.34	97.55	92.33	127.30	RI, MS, Co-injection
7	1189	alpha-terpineol	100	87.33	100	101.33	92.33	91.33	89.33	91.33	90.33	117.67	RI, MS, Co-injection
8	1193	<i>cis</i> -dihydrocarvone	- ^d	-	-	13.83	-	-	-	5.32	9.57	13.83	RI, MS, Co-injection
9	1201	<i>trans</i> -dihydrocarvone	-	-	-	8.97	-	12.41	7.59	15.86	13.10	21.38	RI, MS, Co-injection
10	1217	<i>trans</i> -carveol	-	-	-	17.93	5.52	17.93	8.28	15.86	17.93	21.38	RI, MS, Co-injection
11	1230	nerol	100	91.73	94.40	98.92	103.24	91.01	85.97	83.09	83.81	109.35	RI, MS, Co-injection
12	1238	neral	-	-	-	6.83	-	3.96	1.08	6.47	5.76	8.99	RI, MS, Co-injection
13	1253	geraniol	100	92.73	98.18	101.82	101.09	89.45	85.82	83.64	81.82	108.36	RI, MS, Co-injection
14	1290	thymol	100	92.99	103.05	103.96	96.65	94.82	92.38	95.43	92.38	126.22	RI, MS, Co-injection

^a Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

^b Average of relative peak area percentage about initial peak area in GC integration(n=3).

^c Compounds were identified on the basis of the following criteria: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass, Spectral(1995)(Hewlett Packard Cp.,Polo Alto., CA, USA), and retention indices consistent with that of the literature[Konjoyan(1996), Adams(2002), Acree and Ahn(1997)], MS, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database. Identification based on co-injection with authentic compounds.

^d Not detected.

Table 3-13. Compositional changes in citrus flavor compounds in ethanol solvent stored at 45°C for 16 weeks.

No.	RI ^a	Possible compounds	P.A.(%) ^b										ID ^c
			initial	1	2	3	5	6	8	10	12	16	
1	1073	<i>trans</i> -linalool oxide	100	95.50	105.41	105.41	91.89	94.59	90.99	104.50	95.50	127.93	RI, MS, Co-injection
2	1087	<i>cis</i> -linalool oxide	100	99.00	111.00	108	102	108	98	107	102	144	RI, MS, Co-injection
3	1097	linalool	100	94.68	102.66	101	97.67	95.68	93.69	98.34	95.68	123.92	RI, MS, Co-injection
4	1137	<i>cis</i> -limonene oxide	100	81.05	74.74	49.47	60	40	35.79	26.32	54.74	23.16	RI, MS, Co-injection
5	1142	<i>trans</i> -limonene oxide	100	87.14	93.57	77.14	87.86	73.57	50.71	64.29	70	74.29	RI, MS, Co-injection
6	1177	terpinen-4-ol	100	96.19	103.11	105.54	98.96	97.23	95.16	104.50	98.96	129.07	RI, MS, Co-injection
7	1189	alpha-terpineol	100	97.13	105.73	105.38	97.85	97.85	101.08	100	99.28	124.73	RI, MS, Co-injection
8	1193	<i>cis</i> -dihydrocarvone	- ^d	-	-	-	-	-	-	-	3.16	7.37	RI, MS, Co-injection
9	1201	<i>trans</i> -dihydrocarvone	-	-	7.86	2.86	-	9.29	4.29	15	9.29	19.29	RI, MS, Co-injection
10	1217	<i>trans</i> -carveol	-	-	-	-	-	11.43	-	7.86	5.00	8.57	RI, MS, Co-injection
11	1230	nerol	100	97.74	105.28	103.40	103.02	98.49	92.83	91.70	95.85	113.58	RI, MS, Co-injection
12	1238	neral	-	-	-	-	-	-	-	6.04	3.40	6.79	RI, MS, Co-injection
13	1253	geraniol	100	96.65	104.46	101.86	98.51	94.42	89.96	90.33	92.19	108.92	RI, MS, Co-injection
14	1290	thymol	100	99.03	107.74	107.42	98.71	98.71	97.42	100.97	98.71	128.06	RI, MS, Co-injection

^a Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

^b Average of relative peak area percentage about initial peak area in GC integration(n=3).

^c Compounds were identified on the basis of the following criteria: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass, Spectral(1995)(Hewlett Packard Cp.,Polo Alto., CA, USA), and retention indices consistent with that of the literature[Konjoyan(1996), Adams(2002), Acree and Ahn(1997)], MS, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database. Identification based on co-injection with authentic compounds.

^d Not detected.

Table 3-14. Compositional changes in citrus flavor compounds in propylene glycol solvent stored at 25°C for 16 weeks.

No.	RI ^a	Possible compounds	P.A.(%) ^b										ID ^c
			initial	1	2	3	5	6	8	10	12	16	
1	1073	<i>trans</i> -linalool oxide	100	93.81	97.35	93.81	83.19	90.27	88.50	93.81	75.22	126.55	RI, MS, Co-injection
2	1087	<i>cis</i> -linalool oxide	100	92.45	102.83	100.00	98.11	102.83	99.06	100.00	87.74	132.08	RI, MS, Co-injection
3	1097	linalool	100	90.06	97.76	101.60	89.10	91.67	87.82	89.42	82.05	126.92	RI, MS, Co-injection
4	1137	<i>cis</i> -limonene oxide											RI, MS, Co-injection
5	1142	<i>trans</i> -limonene oxide	100	79.79	76.60	59.57	63.83	41.49	32.98	28.72	27.66	43.62	RI, MS, Co-injection
6	1177	terpinen-4-ol	100	88.28	83.45	71.03	78.62	62.76	42.07	55.17	46.90	60.69	RI, MS, Co-injection
7	1189	alpha-terpineol	100	89.26	96.32	100.61	86.81	89.26	85.58	90.18	84.36	123.93	RI, MS, Co-injection
8	1193	<i>cis</i> -dihydrocarvone	100	89.67	96.00	101.33	87.33	88.00	92.33	86.67	79.33	128.67	RI, MS, Co-injection
9	1201	<i>trans</i> -dihydrocarvone	- ^d	-	-	15.96	-	5.32	-	-	1.06	7.45	RI, MS, Co-injection
10	1217	<i>trans</i> -carveol	-	-	-	6.21	6.21	11.03	15.17	14.48	14.48	17.93	RI, MS, Co-injection
11	1230	nerol	-	-	-	12.41	11.03	17.24	15.17	13.79	11.03	12.41	RI, MS, Co-injection
12	1238	neral	100	93.88	93.53	97.84	94.60	89.57	80.58	82.73	74.46	119.06	RI, MS, Co-injection
13	1253	geraniol	-	-	-	-	-	3.96	-	5.76	5.40	4.68	RI, MS, Co-injection
14	1290	thymol	100	95.64	97.82	99.27	92.00	88.36	84.00	83.64	75.64	121.09	RI, MS, Co-injection

^a Retention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

^b Average of relative peak area percentage about initial peak area in GC integration(n=3).

^c Compounds were identified on the basis of the following criteria: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass, Spectral(1995)(Hewlett Packard Cp.,Polo Alto., CA, USA), and retention indices consistent with that of the literature[Konjoyan(1996), Adams(2002), Acree and Ahn(1997)], MS, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database. Identification based on co-injection with authentic compounds.

^d Not detected.

Table 3-15. Compositional changes in citrus flavor compounds in propylene glycol solvent stored at 45°C for 16 weeks.

No.	RI ^a	Possible compounds	P.A.(%) ^b										ID ^f
			initial	1	2	3	5	6	8	10	12	16	
1	1073	<i>trans</i> -linalool oxide	100	92.79	97.30	100.90	100.00	100	93.75	111.65	87.96	138.10	RI, MS, Co-injection
2	1087	<i>cis</i> -linalool oxide	100	121.00	110.00	113.00	108.00	109	89.00	109.00	94.00	146.00	RI, MS, Co-injection
3	1097	linalool	100	80.73	103.99	105.32	94.68	95.35	95.35	99.67	84.39	127.91	RI, MS, Co-injection
4	1137	<i>cis</i> -limonene oxide	100	66.32	50.53	25.26	13.68	7.37	7.37	8.42	28.42	-	RI, MS, Co-injection
5	1142	<i>trans</i> -limonene oxide	100	69.29	86.43	75.00	67.14	61.43	43.57	60.71	50.71	69.29	RI, MS, Co-injection
6	1177	terpinen-4-ol	100	92.04	104.84	110.38	95.50	97.92	94.46	105.88	92.73	131.83	RI, MS, Co-injection
7	1189	alpha-terpineol	100	94.98	106.45	111.83	98.21	97.85	98.92	102.51	89.61	130.47	RI, MS, Co-injection
8	1193	<i>cis</i> -dihydrocarvone	- ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
9	1201	<i>trans</i> -dihydrocarvone	-	-	-	-	-	-	11.43	14.29	8.57	14.29	RI, MS, Co-injection
10	1217	<i>trans</i> -carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
11	1230	nerol	100	95.47	108.68	110.19	103.40	99.25	92.83	96.98	83.77	123.02	RI, MS, Co-injection
12	1238	neral	-	-	-	-	-	-	-	4.91	-	4.91	RI, MS, Co-injection
13	1253	geraniol	100	95.54	107.06	108.55	96.65	93.31	89.22	95.54	82.53	119.33	RI, MS, Co-injection
14	1290	thymol	100	95.81	110.32	113.55	97.10	99.35	98.39	103.55	93.87	130.65	RI, MS, Co-injection

^aRetention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

^bAverage of relative peak area percentage about initial peak area in GC integration(n=3).

^cCompounds were identified on the basis of the following criteria: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass, Spectral(1995)(Hewlett Packard Cp.,Polo Alto., CA, USA), and retention indices consistent with that of the literature[Konjoyan(1996), Adams(2002), Acree and Ahn(1997)], MS, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database. Identification based on co-injection with authentic compounds.

^d Not detected.

Table 3-16. Compositional changes in citrus flavor compounds in glycerol solvent stored at 25°C for 16 weeks.

No.	RI ^a	Possible compounds	P.A.(%) ^b										ID ^c
			initial	1	2	3	5	6	8	10	12	16	
1	1073	<i>trans</i> -linalool oxide	100	53.11	48.80	58.85	49.28	49.28	46.41	44.50	46.41	72.73	RI, MS, Co-injection
2	1087	<i>cis</i> -linalool oxide	100	54.50	56.61	64.55	49.21	58.20	58.73	49.74	52.91	71.96	RI, MS, Co-injection
3	1097	linalool	100	41.89	41.44	48.80	39.79	35.44	35.29	33.03	35.59	48.95	RI, MS, Co-injection
4	1137	<i>cis</i> -limonene oxide	100	1.95	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
5	1142	<i>trans</i> -limonene oxide	100	22.61	15.36	11.01	3.19	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
6	1177	terpinen-4-ol	100	57.70	58.09	67.06	56.53	50.49	50.49	51.85	51.07	71.35	RI, MS, Co-injection
7	1189	alpha-terpineol	100	57.56	58.19	67.44	57.14	50.84	51.47	52.73	50.42	70.80	RI, MS, Co-injection
8	1193	<i>cis</i> -dihydrocarvone	- ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
9	1201	<i>trans</i> -dihydrocarvone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
10	1217	<i>trans</i> -carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
11	1230	nerol	100	53.37	51.06	58.19	54.53	45.28	42.58	42.20	40.85	56.84	RI, MS, Co-injection
12	1238	neral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
13	1253	geraniol	100	52.08	51.29	56.06	50.10	41.78	37.62	40.99	38.61	53.86	RI, MS, Co-injection
14	1290	thymol	100	54.55	53.87	57.58	52.19	45.45	45.12	48.99	44.78	63.80	RI, MS, Co-injection

^aRetention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

^bAverage of relative peak area percentage about initial peak area in GC integration(n=3).

^cCompounds were identified on the basis of the following criteria: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass, Spectral(1995)(Hewlett Packard Cp.,Polo Alto., CA, USA), and retention indices consistent with that of the literature[Konjoyan(1996), Adams(2002), Acree and Ahn(1997)], MS, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database. Identification based on co-injection with authentic compounds.

^d Not detected.

Table 3-17. Compositional changes in citrus flavor compounds in glycerol solvent stored at 45°C for 16 weeks.

No.	RI ^a	Possible compounds	P.A.(%) ^b										ID ^c
			initial	1	2	3	5	6	8	10	12	16	
1	1073	<i>trans</i> -linalool oxide	100	27.27	52.63	42.11	46.89	53.59	47.37	51.67	43.54	58.37	RI, MS, Co-injection
2	1087	<i>cis</i> -linalool oxide	100	30.69	58.73	49.21	43.92	63.49	61.38	54.50	52.91	67.72	RI, MS, Co-injection
3	1097	linalool	100	18.32	43.69	28.23	37.54	43.84	39.94	36.79	33.18	39.49	RI, MS, Co-injection
4	1137	<i>cis</i> -limonene oxide	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
5	1142	<i>trans</i> -limonene oxide	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
6	1177	terpinen-4-ol	100	32.16	61.79	49.90	53.61	59.45	55.17	54.00	49.71	63.16	RI, MS, Co-injection
7	1189	alpha-terpineol	100	41.60	63.87	56.09	54.41	61.97	56.30	51.68	49.79	61.55	RI, MS, Co-injection
8	1193	<i>cis</i> -dihydrocarvone	- ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
9	1201	<i>trans</i> -dihydrocarvone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
10	1217	<i>trans</i> -carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
11	1230	nerol	100	39.11	56.07	47.40	52.41	56.65	47.40	42.20	38.15	44.32	RI, MS, Co-injection
12	1238	neral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-injection
13	1253	geraniol	100	41.19	56.63	45.15	47.92	53.07	43.37	47.33	36.63	42.97	RI, MS, Co-injection
14	1290	thymol	100	45.29	60.61	54.21	50.34	57.74	52.69	49.49	44.44	53.87	RI, MS, Co-injection

^aRetention indices were determined using n-paraffins C7-C22 as external references.

^bAverage of relative peak area percentage about initial peak area in GC integration(n=3).

^cCompounds were identified on the basis of the following criteria: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass, Spectral(1995)(Hewlett Packard Cp.,Polo Alto., CA, USA), and retention indices consistent with that of the literature[Konjoyan(1996), Adams(2002), Acree and Ahn(1997)], MS, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectral database. Identification based on co-injection with authentic compounds.

^d Not detected.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 및 평가 착안점

구 분	연구목표	평가착안점
1차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고발현 시스템 구축 ○ 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화 ○ Bioconversion 분석 방법 확립 ○ 고농도배양용 bioreactor 제조 ○ 고농도 배양 조건 검토 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고발현 시스템의 구축 ○ 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화 ○ gas feeding bioreactor 제작 ○ 고농도 배양 ○ 특허출원
2차 년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Bioessential oil의 추출 수율 증대 공정 확립 ○ 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의 생산 ○ 고농도 배양 시 induction 조건의 최적화 ○ Continuous bioconversion process 공정 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Bioessential oil의 추출 공정 확립 ○ 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의 생산 ○ 대량 bioconversion process 구축 ○ product 회수 system 구축 ○ 특허출원
3차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시작품 제작 ○ 시작품의 quality control ○ 특허 출원 ○ 시작품 제작 ○ 시작품 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 시작품 <ul style="list-style-type: none"> · 일반 배양에 의한 시작품 · 고농도 배양에 의한 시작품 ○ 시작품의 품질 ○ 시작품의 용도 확대 ○ 특허출원

제 2 절 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도

• 제1세부과제 : Bioessential oil 생산을 위한 미생물 생전환 및 발현 시스템의 개발

1) 고발현 시스템 구축

① 고발현용 host vector system

유자정유 대사능 유전자 3종(CD3: 8.6kb, CD4: 4.6kb, CD6: 7.7kb) 고발현 host-vector system에 옮기고 이 고발현 시스템에서 유자정유를 유일한 탄소원으로 하는 배지에서 일반 vector system에서보다 약 10배 이상의 cell mass를 얻었으며, 이때의 성장 곡선 및 최대 성장 조건을 확립하였다.

② 유자정유 대사능 유전자의 분석

본 연구에서의 3종의 유자정유 대사능 유전자는 본 연구팀이 세계 최초로 클로닝한 유전자이며, 이 유전자를 지닌 미생물의 대사능은 기존의 보고된 terpene화합물 대사능 미생물보다 매우 우수하다. 이 유전자의 DNA 염기 서열을 규명하고 그 유전자를 분석하였다. 본 유전자는 terpene화합물을 광범위하게 대사할 수 있는 유전자 서열에 관한 세계최초의 보고이다.

2) 생전환을 위한 미생물 시스템의 안정화

① 유자정유 대사능 유전자의 고발현 시스템에서의 발현

당해연도에 구축된 고발현 시스템 하에서 3종의 유자정유 대사능 유전자들을 발현시켜 그 최적 생전환 조건확립 및 고발현 시스템 하에서의 생전환

화합물을 분석하였다.

3) Bioessential oil추출 수율증대 공정

전년도에 구축된 고발현시스템 하에서 또는 유자정유대사능이 우수한 모균주와 고발현시스템의 조합에 의하여 유자정유를 생전환시킨 미생물의 배양액으로부터 Bioessential oil을 추출하기 위하여 추출기를 제작하였다. Bioessential oil을 추출하기 위하여 용매추출을 사용한 경우 Bioessential oil추출량은 $1\mu\text{l}$ Bioessential oil/mL배양액 이었으며 소요시간은 6min/mL 배양액 이었다. 당해 년도에 제작된 추출기를 사용하면 Bioessential oil 추출량 $0.04\mu\text{l}/\text{mL}$ 배양액(25배↓) 소요시간은 4.8sec/mL배양액(75배↑)으로 나타났다. 즉 획득한 Bioessential oil 양으로 비교하면 25배 감소하나 시간적으로 보면 75배 이상 빨리 Bioessential oil을 획득할 수 있다. 추출기를 사용하면 용매추출의 가장 큰 단점인 폐유기용매의 발생을 크게 줄일 수 있다는 점에서 미생물 생전환에 의한 Bioessential oil의 산업적 대량생산에서 Bioessential oil을 생산할 수 있는 실질적으로 적용 가능한 방법으로 제안된다.

4) 미생물학적 조향기법에 의한 Bioessential oil의생산

모균주와 유자정유대사능 유전자를 지닌 형질전환주(고발현 host-vector system)의 배양액을 적정 비율로 혼합하여 미생물학적조향을 시행하여 그 향기물질들을 분석하였다. 각각의 균주를 단독 배양하여 유자정유를 생전환하는 경우에는 linalool, 4-terpineil, α -terpineol이 주화합물로 검출되었으나, 미생물 조향법에 의해서는 carvone이 전체 생전환 화합물의 주종(59~78%) 화합물을 차지하였다. 최종 추출물(Bioessential oil)의 향기도 조향된 시료와는 다르게 나타나 본 방법에 의하여 보다 다양한 Bioessential oil의 생산

이 가능함을 시사하였다.

5) Bioessential oil의 생산 및 식품에서의 응용(시작품제작)

폐유자박으로부터 유자정유를 추출 후 이를 본 관제에서 개발된 유용미생물을 이용하여 Bioessential oil을 생산하였다. 본 과제 수행 중 모균주인 *E. agglomerans* 6L과 그 유전자 단편들을 지닌 수종의 형질전환주를 이용하여 여러가지 향기를 지닌 Bioessential oil을 제조하였다. 그중 가장 식품(쿠키, 마들렌)에 적용시키기 적합한 향은 모균주인 6L을 이용한 Bioessential oil이었다. 6L에 의해 bioconversion된 Bioessential oil을 이용하여 쿠키 및 마들렌을 제조 시 기호도가 높아 제과, 제빵용 essential oil로 적용하기 적절하였다.

6) Bioessential oil의 급성·아급성 실험

Bioconversion된 Bioessential oil을 식품에 적용하기 위해서 안전성 평가를 수행하였다. 일반적으로 미생물에 의해 생전환된 essential oil은 "natural"로 판정되어 화학적 합성 essential oil 보다는 독성 위험이 낮지만, 본 연구에서의 미생물학적 생전환된 Bioessential oil은 새로운 형태의 Bioessential oil 이므로, 이를 산업화시키기 위하여 안전성평가 자료를 제시하였다.

Mouse를 이용한 급성독성 실험에서는 mouse 체중당(kg) Bioconversion oil 2,000mg에서도 사망례가 관찰되지 않았다. 본 연구에서의 Bioessential oil은 독성 실험 에서도 중독 현상이 보이지 않아 LD₅₀치가 2,000mg/kg 이상인 저독성 물질로 판단되었다. 아급성실험 에서도(16.6 mg/kg)중독 현상을 유발하지 않고 안전하게 사용할 수 있는 물질로 추정되었다.

- **협동과제: 고농도 배양 및 대량 bioconversion system 개발**

- 1) Bioconversion 용 bioreactor의 제조

Limonene이나 유자 정유는 자체가 미생물에 toxic하게 작용하기 때문에 고농도 배양 시 배지 내에 직접 공급(direct feeding)이 불가능하므로, 미생물에 해를 주지 않으면서, 탄소원 및 inducing agent로서의 기능을 수행하기 위하여 특수하게 고안된 bioreactor가 요구되며, 이 bioreactor는 gas 상태로 limonene 또는 유자 정유를 연속적으로 공급할 수 있는 시스템으로 구성되어야 한다. 본 과제에서는 이러한 목적 하에 연구수행 내용 및 결과 부분에 제시된 bioreactor를 자체 제작하여 실험에 사용하였다.

- 2) 재조합 대장균 *E. coli* EC3, 4, 6의 고농도 배양 및 *E. coli* EC4의 induction 형질전환주인 *E. coli* EC3와 EC4는 배양 16시간 이후부터 활발한 세포생장을 이루어 *E. coli* EC3는 33.13 g/L(배양 48시간), *E. coli* EC4는 33.8 g/L(배양 48시간)으로 높은 세포생장을 보였다. 한편 *E. coli* EC6는 다른 형질전환주들에 비해 유도기간이 길었으며 28시간 이후부터 세포생장이 활발하였으며 *E. coli* EC6의 배양 시간과 최대 균체 생산량은 72시간, 35.8 g/L이었다. Limonene에 의한 bioconversion system의 induction을 이루기 위하여 가스 상태로 limonene을 feeding하면서 배양된 대장균 *E. coli* EC4는 최종 균체량은 38.58g/L이었으며, bioconversion system의 유도는 SDS-PAGE 분석과 가스 크로마토그래피로 확인하였다.

- 3) Bioconversion product의 분석

Reactor내에서의 시간별 반응물의 분석은 SPME 방법을 이용하여 분석하였으며, 반응액과 reactor를 통과하여 -70℃에서 포집된 정유부분은 ether

추출법으로 추출한 다음 분석하였다. 형질 전환주가 생산한 생전환 된 물질 중 시간이 지남에 따라서 linalool이 가장 많이 생성되었으며 배양시간 72시간째 최고에 달하였다. 그 외에 4-terpoinol, α -terpineol, nerol, verdiflorol등이 검출되었다.

- 4) 유자정유의 공급량 결정 : 기체상태로 공급 시 공기량에 대한 유자 정유량의 관계 규명 유자 정유를 미생물에 탄소원 및 bioconversion 대상으로 공급할 때, 액상으로 첨가 시에는 미생물이 사멸하기 때문에 발효조에 첨가되는 공기를 limonene 또는 유자 정유를 1차적으로 통과시킴으로써 발효조에 기체상태로 limonene 또는 유자 정유를 공급하여 목적하는 bioconversion process를 정립하였다.

- 5) 최적 정유 공급량의 결정

공급되는 air 양을 조절함으로써 bioreactor 내에 공급되는 limonene 또는 유자 정유량을 조절할 수 있었으며, 본 연구 결과 0.25, 0.5, 1.0 그리고 2.0 VVM의 유량으로 정유 공급 시 1.0VVM이 가장 좋은 생전환율을 보였다.

- 6) 생전환시기의 결정

공기량을 1.0VVM으로 설정하고 limonene 또는 유자 정유를 공급했을 경우, 생전환과 미생물 배양을 동시에 진행했을 경우는 72시간째에 가장 많은 전환율을 보였으나, 미생물의 고농도배양 후에 균체만으로 생전환을 시켰을 경우 96시간의 반응시간에서 가장 좋은 전환율을 나타내었으며, 그 이상의 반응시간에서는 오히려 반응물의 감소하는 경향을 보였으므로 생전환 반응시간은 96시간 부근이 가장 적당하였다.

7) 최적 연속 전환 system 확립

최적 연속 생전환 시스템을 확립하기 위하여 2가지 방법을 사용하였다. 하나는 균체의 고농도 배양과 더불어 동시에 생전환 반응을 진행하는 것이고, 다른 한 시스템은 고농도 배양이 끝난 후 균체를 일정 농도로 희석한 다음, 배양을 중지한 상태에서 limonene 또는 유자 정유만을 공급함으로써 생전환을 유도하는 시스템을 사용하였다. 각 시스템이 장단점이 있지만 최종 product의 순도 또는 이 물질의 제거라는 측면에서 배양후의 균체를 이용한 일종의 fluid packed reactor 시스템이 보다 적절한 생전환 시스템으로 판명되었다.

8) Bioessential oil의 회수 방법 확립

생전환 된 product를 회수하기 위하여 3가지 방법으로 반응물을 회수하였다. 하나는 reactor내에 잔존하는 반응물을 ether를 사용하여 포집하는 것이고, 나머지 2 방법은 reactor에서 배출되는 반응물을 에탄올 그리고 ether를 사용하여 순차적으로 발생하는 반응물의 용매에 대한 용해도 차를 이용하여 포집하는 방법을 사용하였다. 이중에서 가장 많은 생전환 된 반응물은 reactors내에 잔존하는 반응물질과 ether로 포지집한 경우가 우수하였으며, 특히 ether의 경우 ν -terpinene이 특징적으로 포집되는 경향을 보여주었다.

9) Limonene 및 유자 정유의 생전환물의 분석

Limonene을 생전환 시켜 얻어진 물질 중 trans linalool oxide가 145 mg/L로 가장 많이 검출이 되었으며 4-terpineol은 108 mg/L, linalool은 86 mg/L, linalool oxide는 89 mg/L 그리고 α -terpineol은 6 mg/L였다. 반면 유자정유로부터 생전환되어 얻어진 물질로는 α -terpineol이 273 mg/L로

높으며, trans linalool oxide는 128 mg/L, linalool oxide는 116 mg/L 그리고 4-terpineol은 limonene feeding에서 얻어진 것보다 3배정도 더 많은 298 mg/L로 차이가 났다.

10) 시작품의 실험실 규모 제작

limonene 및 유자 정유를 생전환하여 각 3종씩 6종의 Bio-essential oil 제조하였다.

11) 시작품의 평가 : 관능 및 향균력 평가

제조된 6종의 생전환시작품에 대한 품질을 10인의 관능 요원을 구성하여 평가한 결과 6종 모두 limonene 또는 유자 정유와는 다른 향으로 평가된 base에 limonene 또는 유자 향에 관한 관능이 느껴지고 있으며, 일부 향은 woody 향을 강하게 느끼는 것으로 분석되었다. 또한 제조된 생전환 물질은 limonene이나 유자 정유 원액보다는 향균력이 감소하였으나 대장균이나 고초균에 대하여는 향균력을 나타내고 있었다.

● 위탁과제: 생전환 향기성분의 분석 및 안정성 평가

- 1) 효율적 추출법 및 분석법 확립: 미생물을 이용하여 생전환 된 향기 성분의 효율적인 추출법 및 분석법을 확립하여 시료간의 정성적 및 정량적 차이를 규명할 수 있었다.
- 2) Active-aroma compound: 생전환 된 향기 성분 중 향기활성을 지니나 미량으로 존재하는 linalool oxide, geraniol, nerol 등의 oxygenated terpene 류들을 동정하였다. 이들 성분들은 관련 제품의 향기특성에 큰 영향을 미칠 것으로 사료된다.
- 3) 향기성분의 안정성: 주요 유자 향기 성분의 flavoring solvents에 따른 저장기간 중 안정성을 평가하였으며, 저장 기간 중 이들 성분의 정성 및 정량적 변화를 규명하였다.

제 5 장 연구개발의 활용계획

○ 우리 농산물을 이용한 우수 상품 개발 및 새로운 소재 개발 기술 확보

본 연구에서 개발된 생전환 기술은 우리의 다양한 정유제품의 품질 및 가치를 상승시킬 수 있으며, 특히 유자나 제조도에서 대량 생산된 감귤류에 적용할 경우 큰 부가가치를 창출할 수 있다.

○ 난분해성 또는 독성 물질의 분해에의 적용

가스 형태로 미량 지속적으로 물질을 공급해줌으로써 미생물에 해를 주지 않고 ei사를 진행시키는 본 연구의 생전환 방법은 난분해성인 terpenoid 화합물 소재의 분해도 향상 및 환경 정화제로서의 활용이 가능하다.

○ Bioessential oil 제조

미생물이 생산하는 Bioessential oil은 천연향으로써 합성향이나 식물체 추출향에 비해 안전성면이나 가격면에서 우수하다. Bioessential oil은 그 자체가 하나의 상품성을 지닐 뿐 아니라 이를 활용한 다양한 제품개발이 식품, 의약, 향장품 등에 적용될 수 있다. 또한 유자정유 대사능 미생물의 유전자 조합에 따라 '미생물학적 조향'이 가능하여 다양한 향기를 지닌 Bioessential oil제조가 가능하다.

○ 핵심기술의 개발

미생물 대사공학에 의한 정유(Bioessential oil)성분 생전환 기술은 생명공학 분야에 해당하는 기술로 첨단과학형, 대규모 관련 산업 발전에 직접적 응용 및 수출산업화와 수입대체 효과, 천연물 생산에 의한 안전성 증대가 가능하

다는 특징을 지닌다. 이 기술은 폐유자박 내의 정유성분을 미생물에 의해 생전환 시키므로 고부가가치의 Bioessential oil을 생산할 수 있는 방법으로 1) 정유성분 대사능 미생물의 확보, 2) 주요 대사경로 유전자의 구조 및 기능 규명; 유용 유전자의 확보, 3) 생전환 Bioessential oil의 효율적 생산기술 확보; bioreactor내에서의 생전환기술 등의 내용으로 구성되어 있다.

1) 유용 미생물(모균주): *E. agglomerans* 6L

- ① limonene과 유자정유성분(limonene 외에도 다수의 terpene화합물들의 혼합물)을 대사할 수 있는 미생물
- ② 기존의 보고된 limonene이나 terpene화합물 대사 미생물 보다 훨씬 높은 대사능: limonene 독성에 대한 저항성이 기존의 보고에서 보다 30배 이상 ↑

2) 유용유전자(형질전환주) 유자정유 대사능 유전자 클로닝

- ① 유자정유 대사능 유전자: (CD3: 8.6kb, CD4: 4.6kb, CD6: 7.7kb)를 지닌 형질전환주 (vector pUC18 in *E. coli* TG1): EC3, EC4, EC6
- ② High level expression system : ECC3, ECC4, ECC6
- ③ Subcloning을 통한 citron oil degrading gene 확보
→ 기존의 gene과 유사관계 분석완료

3) 생전환 Bioessential oil의 효율적 생산기술 확보

- ① 미생물학적 조향에 의한 향기물질 생성기법
- ② 현재까지 기체상태로 탄소원을 미생물에 공급하여 생전환 반응을 진행시킨 보고는 없었으며, 본 연구에서 사용한 bioreactor내에서의 생전환 기술은 향후 액상으로 공급하기 어려운 성분의 대량 공급 및 전환에

활용 될 수 있을 것이다.

4) 생전환 향기성분의 분석 및 안정성 평가

- ① 폐유자박으로부터 생전환 된 향기성분들의 분석을 위하여 수립된 정성 및 정량적 분석법은 폐유자박 및 관련 제품의 품질 평가법에 이용될 수 있으며, 시료 간 향기성분들의 정성 및 정량적 차이를 밝히는데 사용될 수 있다.
- ② 저장기간과 저장온도에 따른 서로 다른 flavoring solvents에서의 주요 유자 향기성분의 안정성에 대한 결과는 폐유자박으로 생전환 된 향기성분들을 이용한 제품 개발 시제품의 품질과 유통기간을 증대시키는데 활용될 수 있다.

제 6 장 참고문헌

1. Abraham, W.R., Kieslich, K., Reng, H., and Stumpf, B. (1984) Formation and production of 1,2-trans-glycols from various monoterpenes with 1-menthene skeletons by microbial transformations with *Diplodia gossypina*. Third Eur. Congr. Biotechnol. Vol 1. p 245. Verlag Chemie. Deerfield Beach. FL
2. Bowen, E.R. (1975) Potential by products from the microbial transformation of d-limonene. Proc. Fla. State Hort. Soc. 88: 305
Braddock, R.J. and Cadwallader, K.R. (1992) Citrus by products manufacture for food use. Food Technol. 40(2): 105-110
3. Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., and Higgins, D.P.(1989) Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*, J. Food Sci. 54: 1241-1245
4. Chang, H.C., Gage, D.A., and Oriel, P. (1995) Cloning and expression of limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. J. Food Sci. 60: 551
5. Chang, H.C., and Oriel, P. (1994) Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. J. Food Sci. 59: 660
6. Chung, J., Lee, Y., Lee, K., Kim, I. and Lee, M. (1998) Manufacture condition of oleoresin using citron peel. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 139-145
7. Dhavlikar, R.S. and Bhattacharyya, P.K. (1966) Microbiological

- transformations of terpenes: Prat VIII. Fermentation of limonene by a sole Pseudomonad. *Indian J. Biochem.* 3: 144-157
8. Feraloni, G. (1975) *Handbook of flavor Ingredients*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL
 9. Jeong, J., Lee, Y., Lee, K., Kim, I., and Lee, M. (1998) Manufacture condition of oleoresin using citron peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 139
 10. Kieslich, K., Abraham, W.R., Stumpf, B., Thede, B., and Washausen, K. (1986) Transformation of terpenoids. In *Progress In Essential Oil Research*. XVI. Ernst-Joachim Brunke (Ed.). 367-394
 11. Kraidman, G., Mukherjee, B.B., and Hial, I.D. (1969) Conversion of d-limonene into an optically active isomer of α -terpinenol by *Cladosporium* species. *Bacteriol. Proc.* 69: 63
 12. Krasnobajew, V. (1984) Terpenoids Ch. 4. In *Biotechnology-Biotransformations*, Vol 6a, K. Lieslich(Ed.), p. 98-125.
 13. Verlag Chemie, Weinheim.Lee, H.Y., Kim, Y.M., Shin, D.H., and Sun, B.K. (1987) Aroma components in Korean citron. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19:361
 14. Lee, J.H., and Park, C.S. (1980) A study an the extraction of essential oil from Korean citrus peels waste. *Korean Research Inst. of Chem. Technol.* p. 39
 15. Miyake, M., Inaba, N., Maeda, H. and Ifuku, Y. (1990) Quality characteristics of Jabra and Yuzu fruit juices. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 37: 346-354
 16. Mukherjee, B.B., Kraidman, G., and Hill, I.D. (1973) Synthesis of glycols

- by microbial transformation of some monocyclic terpenes. Appl. Microbiol. 25: 447
17. Rama Devi, J., and Bhattacharyya, P.K. (1977) Microbiological transformations of terpenes: Part X X III. Fermentation of geraniol, nerol, and limonene by a soil pseudomonad, *Pseudomonas incognita*. (linallol strain). Indian J. Biochem. Biophys. 14: 288-291
 18. Rama Devi, J., and Bhattacharyya, P.K. (1977) Microbiological transformations of terpenes: Part X X IV. Pathways of degradation of linalool, geraniol, nerol, and limonene by *Pseudomonas incognita*. Indian J. Biochem. Biophys. 14: 359-363
 19. 장해춘, 김인철. (2000) 폐유자박을 이용한 고부가가치 제품제조 기술 개발. 농림기술개발과제 2차년도 연차실적 보고서
 20. 장해춘, 김인철. (2000) 미생물의 대사체계를 이용한 향기물질의 생산. 한국 식품과학회 64회 학술발표회, Proceeding. Pp. 193-205
 20. 전남발전 연구원 (1995) 유자산업의 실태와 경쟁력 제고 전략. 전남발전 연구원 고흥군 보고서

3장 1절 - 참고문헌

1. Abraham, W.R., kieslich, K., Reng, H., and Stumpf, B. (1984) Formation and production of 1,2-trans-glycols from various monoterpenes with 1-menthene skeletons by microbial transformations with *Diplodia gossypina*. Third Eur. Congr. Biotechnol. Vol 1. p 245. Verlag Chemie. Deerfield Beach. FL
2. Bowen, E.R. (1975) Potential by products from the microbial

- transformation of d-limonene. Proc. Fla. State Hort. Soc. 88: 305
- Braddock, R.J. and Cadwallader, K.R. (1992) Citrus by products manufacture for food use. Food Technol. 40(2): 105-110
3. Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., and Higgins, D.P.(1989) Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*, J. Food Sci. 54: 1241-1245
 4. Chang, H.C., Gage, D.A., and Oriel, P. (1995) Cloning and expression of limonene degradation pathway from *Bacillus stearothersophilus* in *Escherichia coli*. J. Food Sci. 60: 551
 5. Chang, H.C., and Oriel, P. (1994) Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothersophilus*. J. Food Sci. 59: 660
 6. Cheong, T. K.; Oriel P. J. Cloning and Expression of the LimoneneHydroxylase of *Bacillus stearothersophilus* BR388 and Utilization in Two-Phase Limonene Conversions, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, 903-915.
 7. Chung, J., Lee, Y., Lee, K., Kim, I. and Lee, M. (1998) Manufacture condition of oleoresin using citron peel. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 139-145
 8. Dhavlikar, R.S. and Bhattacharyya, P.K. (1966) Microbiological transformations of terpenes: Prat VIII. Fermentation of limonene by a sole Pseudomonad. Indian J. Biochem. 3: 144-157
 9. Jeong, J., Lee, Y., Lee, K., Kim, I., and Lee, M. (1998) Manufacture condition of oleoresin using citron peel. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 139
 10. Krasnobajew, V. (1984) Terpenoids Ch. 4. In *Biotechnology-Biotransfo-*

rmations, Vol 6a, K. Lieslich(Ed.), p. 98-125.

11. Lee, J.H., and Park, C.S. (1980) A study an the extraction of essential oil from Korean citrus peels waste. Korean Research Inst. of Chem. Technol. p. 39
12. Rama Devi, J., and Bhattacharyya, P.K. (1977) Microbiological transformations of terpenes: Part X X III. Fermentation of geraniol, nerol, and limonene by a soil pseudomonad, *Pseudomonas incognita*. (linalol strain). Indian J. Biochem. Biophys. 14: 288-291
13. Rama Devi, J., and Bhattacharyya, P.K. (1977) Microbiological transformations of terpenes: Part X X IV. Pathways of degradation of linalool, geraniol, nerol, and limonene by *Pseudomonas incognita*. Indian J. Biochem. Biophys. 14: 359-363
14. 장해춘, 김인철. (2000) 폐유자박을 이용한 고부가가치 제품제조 기술 개발. 농림기술개발과제 2차년도 연차실적 보고서
15. 장해춘, 김인철. (2000) 미생물의 대사체계를 이용한 향기물질의 생산. 한국식품과학회 64회 학술발표회, Proceeding. Pp. 193-205

3장 2절 - 참고문헌

1. W. F. Erman. 1990. Chemistry of the monoterpenes. Marcel dekker Inc., New York
2. Chung, J., Lee, Y., Lee, K., Kim, I. and Lee, M. 1998. Manufacture condition of oleoresin using citron peel. Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 139-145
3. Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., and Higgins, D.P. 1989.

- Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*, J. Food Sci. 54:1241-1245
4. M. J. van der Werf, J. A. M. de Bont and D. J. Leak 1997. Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol, 55 : 147-177
 5. 장해춘, 김인철. 2000. 미생물의 대사체계를 이용한 향기물질의 생산. 한국 식품과학회 64회 학술발표회, Proceeding. Pp. 193-205
 6. R. S. Dhavalikar and P. K. Bhattacharyya 1996. Microbial transformations of terpenes. part VIII Fermentation of limonene by a soil pseudomonas. Indian Biochem., 3 : 144-157
 7. Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., and Higgins, D.P. 1989. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*, J. Food Sci. 54: 1241-1245
 8. E. van Ponsburg, N. M. van der Walf, P. J. Botes and M. S. van Dyk 1997. Biotransformation of (+)-limonene and (-)-piperitone by yeasts and yeast-like fungi. Biotechnol. Lett., 19 : 779-782
 9. Krasnobajew, V. 1984. Terpenoids Ch.4. In *Biotechnology-Biotransformations*, Vol 6a, K. Lieslich(Ed.), p. 98-125. Verlag Chemie, Weinheim.
 10. 장해춘, 김인철 2001. 폐유자막을 이용한 고부가가치 제품제조 기술 개발. 농림부
 11. S. G. Gantwell, E. P. Lau, D. S. Watt and R. R. Fall 1978. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* Sp. J. Bacteriol., 135 : 324
 12. A. Inoue and K. Horikoshi 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. Nature, 338 : 264-266
 13. Chang, H. C.; Gage D. A.; Oriel P. J. 1995. Cloning and expression of

- a limonene degradation Pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *E.coli*. *J. Food Sci.* 60: 551-553.
14. Tae K, Cheong; Patrick J. Oriel. 2000. Cloning and expression of the limonene in two-phase limonene conversions. *Applied Biochem. & Biotech.* vol 84-86, 903-915

3장 3절 - 참고문헌

1. H.Y.Lee, W.D.Hawer, D.H.Shin and D.H.Chung. Analysis of the Aroma Constituents of Korean mandarin (*Citrus reticula*) and Orange Juices by Capillary GC and GC/MS. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19(4):346-354 (1987).
2. J.W.Jeong, Y.C.Lee, J.H.Kim, O.W.Kim and N.G.Bae. Cooling Properties and Quality Changes during Storage of Citron (*Citrus junos*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 28(6):1071-1077 (1996).
3. S.K.Chung, S.H.Kim, Y.H.Choi, E.Y.Song and S.H.Kim. Status of Citrus Fruit Production and View of Utilization of Cheju. *Food Industry and Nutrition.* 5(2):42-52 (2000).
4. Y.K.Kim, S.W.Hyun and Y.H.Ko. Analysis of Essential Oils from the Peel of Mandarine (*Citrus unshiu Marc. Var. Okitsu*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 31(5):1178-1183 (1999).
5. H.C.Chang and P.J.Oriel. Bioproduction of Perillyl Alcohol and Related Monoterpane by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Food Sci.* 59(3):660-686 (1994).
6. H.C.Chang, D.A.Gage and P.J.Oriel. Cloning and Expression of a

- Limonene Degradation Pathway from *Bacillus stearothermophilus*. J. Food Sci. 60(3):551–553 (1995).
7. Y.J.Park, I.C.Kim and H.C.Chang. Microbial of (+)-limonene by an *Enterobacter agglomerans* Isolate. J. Microbiol. Biotechnol. 13(4):636–639 (2003).
 8. H.-S. Choi and Masayoshi Sawamura. Effect of Storage Conditions on the Composition of *Citrus tamurana Hort. ex Tanaka (Hyuganatsu)* Essential Oil. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66(2):439–443 (2002).
 9. M.Sawamura, U.-S.Son, H.-S.Choi, M.-S.L.Kim, N.T.L.Phi, M.Fears, C.Kumagai. Compositional changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy. Int J Aromather. 14:27–36 (2004).
 10. Simon Muhoho Nijoroge, Hiroyuki ukeda, and Masayoshi Sawamura. Changes of the Volatile Profile and Artifact Formation in Daidai (*Citrus aurantium*) Cold-Pressed Peel Oil on Storage. J.Agric. Food Chem. 51:4029–4035 (2003).
 11. T.Hiramoto, K.Tokoro, and T.Kanisawa. In Flavor Chemistry: Instability of citrus flavors and recent attempts at their stabilization, Roy Teranishi, Emily L.Wick, and Irwin Hornstein (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999; 107–115.
 12. Kondjoyan, N. & Berdaque, J.L. A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds. Ceyrat: Laboratoire Flaveur SRV, 1996.
 13. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Publishing, 2001.