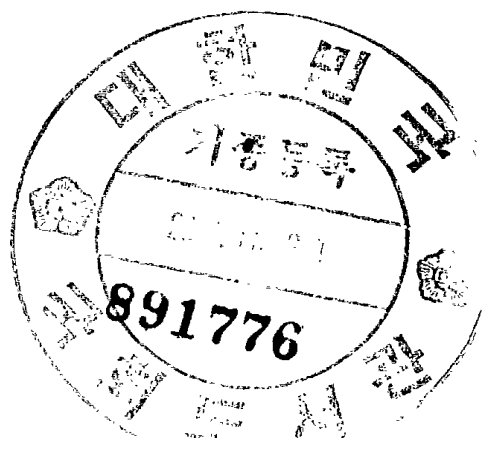


최 중
연구보고서

폐유자박을 이용한 고부가가치 제품제조 기술 개발
Development of making process of highly valuable products
by citron peel waste

연구기관
조선대학교
목포대학교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “폐유자박을 이용한 고부가가치 제품제조 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 12 일

주관연구기관명 : 조선대학교

총괄연구책임자 : 장 해 춘

협동연구기관명 : 목포대학교

협동연구책임자 : 김 인 철

연 구 원 : 정 지 혼

연 구 원 : 강 성 국

여 백

요 약 문

I. 제 목

폐유자박을 이용한 고부가가치 제품제조 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

1996년 이후 과잉 생산되는 유자의 효율적인 활용방안을 개발하여, 유자 소비를 촉진함으로써, 유자 농가의 소득 증대에 기여함이 일차적인 목적이고, 더 나아가 거의 폐자원의 형태로 다량의 과육 및 과피부산물을 이용하여 고부가가치 제품의 제조 기술 개발과 동시에 유자에 함유된 풍부한 정유성분을 생물공학적 기법을 이용하여 고부가가치의 새로운 화합물을 창출하고자 한다. 현재 유자 가공의 부산물로 버려지거나 퇴비화되어 사용되어지는 유자의 과피 및 과육을 이용하여 고부가가치의 정유성분 및 식이 섬유를 분리 정제하여, 기능성 식품 재료 및 향제품을 개발하려한다. 동시에 자원화 할 수 있는 유용 미생물 및 유전자를 개발하여 폐자원으로 버려지고 있는 폐유자박의 유자정유를 고부가가치 정유성분으로 생 전환시키는 미생물 시스템 구축을 연구 목적으로 하고 있다.

2. 연구개발의 중요성

- 유자는 80년대 초반까지는 '큰 규모가 아니었으며, 80년대 중반이 되면서 급격히 증가하고 다시 90년대 중반에 와서 규모면에서 비약적인 발전을 하여 96년 현재 5,121ha에 18,520M/T을 생산하여 일본보다 많은 세계 최대생산국이 되었다. 그러나 유자의 생산량은 비약적으로 증가한 데 비하여 그 가공방법이 낙후되어 소비증가량이 생산증가량에 미치지 못하여, 급기야 96년을 기점으로 유자 가격의 하락을 가져오게 되었고, 유자재배 면적도 더 이상 증가하지 않고 감소하는 추세에 있다.
- 이처럼 유자의 가공방법이 발전하지 못한 원인은 여러 가지가 있겠으나, 일차적으로 유자자체를 다른 과일처럼 생과 형태로 섭취하지 않는다는 점이 가장 큰 문제라고 할 수 있겠다. 유자의 향은 매우 고상하고 기호도가 높은 천연향이나 과일자체가 식품으로서의 가치가 떨어지기 때문에 소비가 증가할 수 없는 실정이고, 또 다른 원인은 우리나라의 식문화에 기인한다고 생각되는데, 우리나라 사람은 대부분의 음식에 특별한 경우를 제외하고는 강한 향이 혼입되는 경우를 싫어하기 때문에 일본에서와 같이 향함유 식품에 대한 거부감이 있어 이를 식품화하는데 어려움이 있기 때문으로 생각된다.
- 이러한 상황에서 유자를 식품소재로 활용하려는 연구는 한계가 있다고 판단되며, 그래서 본 연구진은 유자의 향기물질과 유자에 함유된 기능성 물질, 그 중에서도 펙틴과 식이섬유에 연구 초점을 맞추어 유자 문제를 해결하고자 하였다.
- 본 연구과제는 크게 두 분야로 나누어 진행되었는데 두 분야 모두 유자를 기본 물질로하여 부가가치를 높이는 방향으로 연구가 진행되었다.
 - ① 첫 번째 분야는 산업기반 연구로써 유자에 함유된 풍부한 정유를

활용한 고부가가치 제품 개발로서, 유자에서 추출한 정유자체도 매우 우수한 향장품의 원료로 사용이 가능하지만, 이를 미생물을 이용하여 전환시킴으로써, 보다 부가가치가 높은 제품으로의 전환이 가능하기 때문에, 이러한 연구의 시작점인 미생물의 분리 및 특성 연구 그리고 향 전환에 관여하는 유전자의 특성 분석 등에 관한 연구를 진행시키어 장기적인 안목에서의 미생물 및 유전자원의 확보 그리고 새로운 process 개발을 진행시킬 수 있는 연구에 역점을 둔 분야이고, ② 두 번째 분야는 응용 및 제품화 부문으로 직접 유자로부터 기능성 소재인 정유와 식이섬유 물질 분리 공정의 최적화를 수행하고, 정립된 process로부터 소재를 실험실적인 스케일로 분리하고, 이를 활용하여 시제품을 제조하며, 관심업체에 본 과제에서 개발된 연구 결과를 기술이전하여 바로 산업화가 가능한 분야로 구성되었다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 유자정유 대사능 미생물의 개발

- 유자과피로부터 유자정유 성분의 생전환능을 지닌 미생물의 분리 및 동정
- Limonene의 toxicity test
- 성장과 생전환(bioconversion of limonene)

2. 분리·동정된 균을 이용한 고부가가치 향기물질 생산

- 미생물 배양액으로부터 향기성분추출
- 분리균주가 생산한 향기성분의 관능검사
- 유자정유 배지에서 *Enterobacter agglomerans* 6L 성장곡선
- 생전환된 물질의 GC-MS를 통한 분석
- 생전환된 물질의 GC-sniffing을 통한 분석

3. 유자정유 대사능 유전자의 확보

- *Enterobacter agglomerans* 6L로부터 유자정유 대사능을 지닌 유전자의 클로닝
- 형질전환주가 지닌 유전자의 분석

4. Biotransformation: 형질전환주로부터 유자정유의 생전환

- 균의 생육: 액체배지(M₉ 최소배지)에서의 성장곡선
- 생전환(bioconversion): 고부가가치 향기물질의 생산

5. 유용 향기성분의 최적생산공정 확립

- 단독배양과 공동배양
- 공동배양에 의한 유자정유의 생전환

6. 폐유자박으로부터 정유성분의 추출

- 추출방법의 설정 실험
- 추출방법의 최적화 연구
- 추출방법에 따른 유자 정유성분에 관한 연구
- 유자 정유의 주향 성분에 관한 연구

7. 펙틴 물질의 분리 및 특성 연구

- 펙틴 추출조건의 최적화 연구
- 펙틴의 물리화학적 특성 분석 연구
- 폐유자박으로부터 식이섬유 추출 조건의 최적화

8. 유자 정유 및 식이섬유로부터 시제품 제작

- 유자 정유를 함유한 기능성 투명비누 제조
- 펙틴 물질을 함유한 식이섬유 정제품 제조

9. 유자 식이섬유의 기능성 분석 연구

- 유자 식이섬유가 체중 증가에 미치는 영향
- 유자 식이섬유가 혈중 콜레스테롤 함량에 미치는 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 생물공학적인 기법을 이용한 폐유자껍질로부터 유자정유성분의 생전환

Liomonene과 유자정유를 대사할 수 있는 미생물을 분리하였고 이는 *Enterobacter agglomeranse* 6L로 동정되었다. 분리균주는 기존에 limonene이나 다른 terpenoid화합물을 대사할 수 있는 미생물 보다 훨씬 높은 대사능을 나타내었으며 유자와 같은 감귤류 정유성분의 주성분인 limonene의 독성에 대해 30배 이상 높은 저항성을 나타내었다.

6L이 유자정유로부터 생전환시킨 향기물질은 γ , δ -valerolactone, trans-2-decenal, octanol, cryptone, cuminol, hydroxycitronellol, α -camphereral, δ -cadinol, γ -dodecalactone으로 동정되었다.

6L로부터 유자정유대사능 유전자를 분리하였다. 6L의 염색체 DNA로부터 8.8kb, 4.4kb, 8.2kb의 DNA단편을 얻었으며 이를 지닌 *E. coli* 재조합 균주를 *E. coli* EC3, EC4, EC6라 각각 명하였다. EC3, EC4, EC6는 공통적으로 linalool, 4-terpineol, α -terpineol을 주생전환 산물로 생산하였고, 이외 minor성분들은 각각 조금씩 다르며 이들의 총체적인 조합에 의해 각 형질전환주가 생산하는 향기는 서로 다른 독특한 향을 나타내었다.

형질전환주인 EC3, EC4, EC6는 모균주인 6L보다 안정된 대사계를 지니고 있었으며, 모균주가 배양 120시간(5일)만에 product를 얻을 수 있음에 반해 재조합형질전환주는 24시간(1일)만에 product 회수가 가능하여 높은 경제성을 시사하였다.

형질전환주들을 이용한 유용향기 성분의 최적생산 공정을 확립하기 위하여 각각의 서로 다른 6L의 DNA단편을 지닌 형질전환주들을 혼합하여 공동배양을 수행하였다.

유자정유를 유일한 탄소원인 배지에서 공동배양시 단독배양에서 보다 약 3~4

배 높은 균의 생육을 나타내었다. 더 높은 균의 생육은 생전환 대사산물의 증대와 직결되어 단독배양에서 보다 공동배양에서 1.2~2.5배 더 높은 생전환물을 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 자원화할 수 있는 유용미생물 및 유전자를 개발하고, 폐자원으로 버려지고 있는 유자박내의 유자정유를 고부가가치의 정유성분으로 생전환시킬 수 있는 미생물 대사시스템을 구축하였다.

2. 폐유자박으로부터 정유 및 기능성물질의 분리와 응용

유자 착즙후의 유자박으로부터 용매추출법, carbon dioxide super critical extraction 방법 그리고 상압하에서의 수증기 증류법에 의하여 정유를 추출하여 그 특성과 수율을 비교하였는데, 수율면에서는 methanol을 이용한 용매추출법이 건조중량에 대하여 30.6%로 월등히 우수하였으나, 이때 얻어진 물질은 oleoresin 형태로 매우 식이 검고, 다른 성분이 같이 포함되어 있기 때문에 투명한 향장품 제조시의 소재로 사용하기에는 부적합하다고 판단되었다. carbon dioxide super critical extraction 방법에 의해 추출된 정유는 추출 용제의 특성에 기인하여 주로 비극성 향성분이 주종을 이루는 상태로 유자 정유를 전반적으로 함유하지 못했고, 일부 색소를 함유하고 있으며, 수율도 용매 추출법에 비하여 낮은 결과를 보여 주었다. 수율이 가장 낮은 방법은 상압하에서의 수증기 증류에 의해 추출된 정유로 최고 수율은 약 1.1% 내외(110℃로 추출했을 경우)로 다른 방법에 비하여 매우 낮은 값을 보여주고 있으나, 관능적인 향 특성이 가장 우수하였으며, 투명한 상태의 essential oli의 형태로 추출하므로 향 후 향장품 제조의 소재로 충분히 활용할 수 있을 것으로 판단되어 본 연구에서는 수증기 증류에 의한 정유 추출방법의 최적화를 추진하였다. 결과적으로

수증기 증류에 의한 추출 최적 조건은 추출 수율 및 사용한 utility 양을 감안 하였을 때, 128℃에서 30분으로 결정하였었다. 이때의 정유 추출 수율은 1.33% 였다.

유자박으로부터 또 다른 기능성 물질인 식이섬유를 분리하고자, 펙틴 추출 조건의 최적화 및 식이섬유 조건의 최적화 실험을 수행하였다. 추출용매로서 무기산은 HCl을 그리고 유기산은 citrate와 tartrate를 사용하였다. 각각의 용매에 대하여 추출비율을 달리하여 펙틴을 추출한 결과 1:20이 가장 좋은 비율(건조 유자박 : 용매, w/v)로 나타났으며, 사용한 추출용액의 최적 농도는 무기산(HCl)인 경우는 0.05N, 유기산(citrate, tartrate)인 경우는 0.1N이었다. 펙틴 추출과정에서 펙틴에 잔존하는 당을 제거하기 위해 95% ethanol로 1차 펙틴을 침전시킨 후, 65% ethanol로 6회 세척하였다. 펙틴의 추출 수율은 0.05N HCl은 18.7%, 0.1N citrate는 15.5%, 그리고 0.1N tartrate는 11.4% 이었다. 추출한 펙틴의 DE는 42.97 - 47.55%로 low methoxyl pectin으로 분류될 수 있으며, intrinsic viscosity는 0.94 - 2.63의 범위였다. 분리한 펙틴의 당조성은 무기산(HCl)으로 추출된 펙틴(4.2 - 4.7%)이 유기산(citrate, tartrate)으로 추출된 펙틴(15 - 19%)에 비하여 arabinose가 적은 함량을 나타내었고, rhamnose, xylose, glucuronic acid, galacturonic acid, galactose 그리고 glucose의 당 함량은 추출된 세 종류의 펙틴에서 큰 차이를 보이지 않았다. 식이섬유는 불용성과 수용성 식이섬유로 구분하여 분리하였으며, 분리 수율은 불용성 식이섬유는 29.78%, 수용성 식이섬유는 15.73%를 얻을 수 있었고, 정유추출후의 유자박으로부터는 불용성 식이섬유를 35.07%, 수용성 식이섬유는 12.57%를 얻었다.

분리된 유자 정유와 식이섬유를 이용하여 시제품을 제작하였다. 유자 정유는 유자정유를 함유한 시제품으로 투명 비누를 제조하였으며, 이때, 비누의 기능성을 높이기 위하여 수용성 키토산을 첨가한 비누와 유자박으로부터 추출한 식물성 비타민 A인 카로틴을 함유한 노란색 투명비누를 제조하였다. 식이섬유

는 정제 형태로 시제품을 만들었는데, 0.4g/tablet의 함량을 갖는 제품을 만들었다.

제조한식이섬유의 기능성을 분석하기 하기 위하여 고지식이로 사육한 쥐에 대하여 체중증가율 및 혈중 콜레스테롤 함량을 비교 분석한 결과, 본식이섬유를 함유한 고지식을 섭취한 쥐의 경우 체중 증가율을 일반 대조구에 비하여 빠른 경향을 나타내고 있으며, 혈중 콜레스테롤 함량은 정상쥐가 99.23 ± 15.79 mg/dL, 고지식이군이 388.96 ± 42.39 그리고 본 과제에서 개발한식이섬유를 고지식과 함께 섭취한 처리군이 $92.67 \pm .69$ 로 매우 유의적으로 혈중콜레스테롤 함량을 낮추는 것으로 나타났다.

본 연구는 기존의 유자 가공업체에서 진행되어 오던 유자 가공 방식에서 탈피하여 유자를 일반적인 식품 형태가 아닌 기능성 식품 소재 및 새로운 가공품의 원료로의 전환 가능성을 제시할 수 있으므로 유자 농가 및 유자 가공업체의 홍보자료로 이용하고, 기술이전을 원하는 업체에는 적극적으로 본 과제 성과를 이전하고자 한다.

V. 주요 연구실적 및 성과

가. 논문게재

- 1) 미생물의 대사체계를 이용한 향기물질의 생산 2000. 5. 193-205.

한국식품과학회 proceeding

- 2) *E. coli* 형질전환주의 공동배양에 의한 유자정유의 생전환 2001. 6.

한국가정과학회지 4(1): 79~92. 게재

- 3) Biodegradation of limonene by isolate of *Enterobacter agglomerans*.
J. Agri Food Chem. submitted
- 4) Biotransformation of citron oil by isolate of *Enterobacter agglomerans*.
J. Agri Food Chem. submitted
- 5) Cloning and expression of a citron oil degradation pathway from
Enterobacter agglomerans. *Biotech Letter.* preparation
- 6) 유자로부터 펙틴의 추출 및 이화학적 특성 2001. 8.
한국식품영양과학회지 30(4): 569-573 게재
- 7) 추출 방법에 따른 유자 정유의 향 특성에 관한 연구.
한국식품과학회 투고예정
- 8) 유자 식이섬유의 혈중 콜레스테롤 저하 효과에 관한 연구.
한국식품과학회지 투고예정

나. 학술발표

- 1) 폐유자박의 정유성분을 이용한 고부가가치 생물향수의 개발 1999. 10.
P6-9. 한국식품과학회
- 2) 유자 껍질로부터 유자정유성분(limonene)생전환능 미생물의 분리 및 동정
1999. 10. P6-10. 한국식품과학회
- 3) *E. agglomerans* 6L로부터 유자정유 성분(limonene)대사능 유전자의 클로닝
및 대사산물 분석 2000. 10. P-063. 한국산업미생물학회
- 4) *E.coli* EC3, EC4, EC6의 생육시기에 따른 유자정유의 생전환 2000. 10.
P-064. 한국산업미생물학회
- 5) Bioconversion of citron oil by co-culture of *E.coli* EC3, EC4 and EC6
2001. 4. P08-21. IUFOST

6) Isolation and application of pectic substances from *Citrus junos* peel

2001. 4. P09-62. IUFoST

7) 폐유자박으로부터 정유성분의 추출 및 성분 분석 1999. 10. P3-11.

한국식품과학회

8) 유자박으로부터 펙틴물질의 추출 2000. 5. p3-16. 한국식품과학회

2. 세미나 발표

가. [유자로부터 유용물질의 분리와 응용] 난지과수시험장 고흥유자시험지

2000년 9월 29일(금요일)

3. 기술이전

「폐유자박으로부터 기능성 물질 개발 기술: 정유제조 방법, 펙틴 및 식이 섬유 추출 방법」을 바이오테크(주)와 기술이전 계약을 체결하고자 함.

현재 농림부에 중소기업이 기술이전을 받을 시 적용되는 기술료 감면서류 제출 중. 2001년 12월 경 기술이전 계약 완료 예정

SUMMARY

I. Subject

Development of making process of highly valuable products by citron peel waste

II. Objectives and Significance

1. Objectives

Since 1996, citron had been overproduced and its market price was fallen suddenly, it lasts up to date. To overcome the this difficult situation, very effective process which can increase the consuming amount of the overproduced citron, must be developed. The first objective of this project is to develop the new extraction and utilizing process of citron and manufacture brand new product such as noble essential oils via microbial bioconversion techniques in order to increase the amount of citron consumption and the second one is to find out the commercially valuable components in the citron peel and apply them into functional food or healthy food ingredients such as dietary fiber.

2. Significance

- In the early of 1980's, citron had not been cultured in large scale but in the mid of 1980's, the cultivating area of citron had been increased and in 1996, total cultivating area of citron was 5,121ha and total productivity of citron was 18,520 M/T. Although the production amount of citron was increased but the food processing technology of citron had been very old, not developed, therefore the consuming amount of citron had been fixed, the price of citron was fallen and recently the cultivating area of citron was decreased
- The reason that citron food processing technology has not been developed is that the citron is not be able to be eaten as fresh fruit due to it's strong sour taste also, most korean people like the citron flavor and they feel it as noble and flesh but they would not use the citron flavor as seasonings. This is really different food culture from Japan's food culture.
- Considering the above mentioned situations, it can be possible to give judgement that there is a limit in using the citron as food itself and/or food ingredients. Therefore our researches are focused on the utilization of the citron flavor as essential oils and functional materials, especially citrus pectin and dietary fibers from citron peels.
- Our research proposal has been divided into two parts, and the aims of all parts are focused on improving the citron's values using the citron peel as starting materials. ① The first part is focused on research of industrial base, is developing the product which comes out from

applications of citron's essential oils. The essential oils extracted from citron can be used not only as basic materials in cosmetic industries but also as starting materials of microbial bioconversion to convert the citron essential oils more valuable natural essential oils which is different from original citron essential oils. To achieve the goals, Isolation and identification of microbes from soils, characterization of enzymatic process involved in bioconversion process, and researches on genetic analysis will be accomplished. ② The second part is focused on application and analyzing the possibilities of commercialization the functional ingredients of citron to cosmetics such as soap and healthy foods such as dietary fiber. To achieve the goals, optimum conditions of extraction process of essential oils, pectin and dietary fiber, setup of manufacturing process of applicable products such as soap and dietary fiber, and preclinical test (animal test) for evaluation of functional properties will be accomplished.

III. Contents and Scope of Research

1. Development of microorganism containing citron oil degrading pathway

- Isolation and identification of microorganism containing citron oil degrading from citron peel
- Toxicity test of limonene
- Bioconversion of limonene

2. Production of highly valuable flavor compounds by isolates

- Extraction of bioconverted products from the microbial culture
- Olfactory test of bioconverted products by isolates
- Growth of *Enterobacter agglomerans* 6L in M9 minimal broth with citron oil
- GC-MS analysis of bioconverted products
- GC-sniffing of bioconverted products

3. Cloning of citron oil degrading pathway genes

- Cloning of citron oil degrading pathway genes from *Enterobacter agglomerans* 6L
- Characterization of citron oil degrading pathway genes from the transformants

4. Biotransformation

- Growth of *E. coli* transformants on M9 salts supplement with citron oil

- Bioconversion
5. Optimum process of useful bioconverted products
 - Single and associative culture
 - Bioconversion of citron oil by associative culture
 6. Extraction of citron oil from pressed citron peels
 - Methods of extraction
 - Optimization of extraction process
 - Analysis of citron oil compounds by extraction methods
 7. Isolation and characterization of pectin
 - Optimum conditions of pectin extraction
 - Physiological and chemical properties of pectin
 - Extraction of dietary fiber from pressed citron peel
 8. Demonstration of samples by citron oil and dietary fiber
 - Functional transparent soap
 - Tablet of dietary fiber
 9. Functional study of dietary fiber
 - Effect of dietary fiber on weight gaining rate
 - Effect of dietary fiber on lowering blood cholesterol level

IV. Results and Recommendation

1. Bioconversion of Citron oil from citron peel waste.

Microorganism which have limonene and citron oil degrading pathways, was isolated and identified as *Enterobacter agglomerans* 6L. 6L had much higher limonene or other terpenoid compounds catabolism, and higher resistance to limonene toxicity than did other reported microorganisms. γ , δ -Valerolactone, trans-2-decenal, octanol, cryptone, cuminol, hydroxycitronellol, α -camphereral, δ -cadinol, γ -dodecalactone were the bioconverted products from citron oil by 6L.

The pathways encoding citron oil catabolism were cloned as 8.8kb, 4.4kb and 8.2kb chromosomal fragments from 6L into *E. coli* EC3, EC4 and EC6, respectively. EC3, EC4 and EC6 produced linalool, 4-terpineol and α -terpineol were as major bioconverted products, and several minor compounds. The aroma from the *E. coli* transformants were different by the minor compounds. *E. coli* transformants EC3, EC4 and EC6 had more stable citron oil metabolic systems than did 6L. Bioconverted products were produced for 120hr culturing of 6L, but for 24hr culturing of the transformants; which indicates of commercial interest.

Associative culture with three different transformants were tried for the construction of optimal bioconversion process. Associative cultures reached 3~4 times higher cell mass than single culture. The associative cultures of recombinant EC3, EC4 and EC6 proved successful in proving accumulation of bioconversion products (1.2~2.5 times more).

In this study, we developed the useful microorganism and genes as resources and constructed the microbial catabolic systems for bioconversion of citron oil from pressed citron peel waste.

2. Isolation and application of citron essential oil and functional materials

To extract essential oils from citron peel, solvent extraction, carbon dioxide super critical extraction and steam distillation under atmosphere were used and compare the extraction yields and characteristics of each extracts. In the aspect of yield, methanol extraction method(30.6%, DB) was superior to other methods but because the extract (usually called as oleoresin) showed dark-brown color and contained unknown component such as colorants, resin, etc., it was not proper to apply it cometic products such as transparent soap and perfumes etc. The essential oils extracted by carbon dioxide super critical extraction also showed yellowish color and due to the solvent properties(nonpolar properties), it didn't show typical flavor characteristics in GC-MS chromatographic analysis. In case of steam distillation, although extraction yield of essential oil was around 1.1% (extraction temperature was 110°C), but from the sensory evaluation analysis, the essential oils extracted by steam distillation method showed most similar flavor characteristics to natural citron flavor. Also steam-distilled essential oil was transparent and could be applied in making transparent cosmetic products. The optimum temperature and time for steam distillation process was 128°C and 30 minutes, respectively.

To isolate functional food additives from citron peel, Pectin and dietary

fiber was extracted and its isolation process was optimized. A pectic substance from citron peel was extracted with different methods to establish the optimum extraction conditions. The extraction yields of pectin with HCl, citrate and tartrate (concentration : 0.1 N, extraction ratio : 1:20) were 17.9%, 15.6% and 11.4%, respectively. Six times of 65% ethanol washing step was followed after first ethanol precipitation of acid extract for pure pectin. The degree of esterification(DE) of pectins was in the range of 43.0 - 47.6% and intrinsic viscosity was in the range of 0.94 - 2.63(η_{sp}/C (dL/g)). The sugar compositions such as rhamnose, xylose, glucuronic acid, galacturonic acid, galactose and glucose were little different in three kinds of pectins except for the content of arabinose. The extraction yields of soluble and insoluble dietary fiber was 15.73% and 29.78%, respectively.

To analyze the possibilities of commercialization of functional products made by using the citron essential oils and dietary fiber, samples of functional transparent soap and dietary fiber tablet were prepared. In making of transparent soap, the β -carotene which was also extracted in citron peel, was added as antioxidants and carboxy-methyl chitosan was added as moisture retention agents.

In making of dietary fiber tablet, total dietary fiber was used without separating process between soluble and insoluble part. The average weight of tablet was 0.4g. To analyze the functionality of dietary fiber, weight gaining rate and the level of blood cholesterol content against rat which was fed in high fat diet, was examined. The weight gaining rate of treatment(high fat diet containing dietary fiber in total diet) was faster

than those of normal control(normal diet) and fat control(high fat diet). The level of blood cholesterol was decreased significantly in rat which was fed in high fat diet containing dietary fiber. The level of blood cholesterol of normal control, high fat control and treatment was 99.23 ± 15.79 mg/dL, 388.96 ± 42.39 mg/dL and 92.67 ± 69 mg/dL, respectively.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	29
Section 1. Background and Significance	29
1. Technological aspect	29
2. Economical and industrial aspect	30
3. Social and cultural aspect	33
Section 2. Objective and Scope	34
1. Objective	34
2. Scope	36
Chapter 2. Bioconversion of citron oil from citron peel waste	37
Section 1. Introduction	37
Section 2. Development of microorganism containing citron oil degrading pathway	39
1. Isolation and identification of microorganism containing citron oil degrading from citron peel	39
2. Toxicity test of limonene	39
3. Bioconversion of limonene	40
Section 3. Production of highly valuable flavor compounds by isolates	44
1. Extraction of bioconverted products from the microbial culture	44
2. Olfactory test of bioconverted products by isolates	44
A. Total sniffing test	
3. Growth of <i>Enterbacter agglomerans</i> 6L in M9 minimal broth with citron oil	47
4. GC-MS analysis of bioconverted products	48
A. GC-MS analysis	
B. Limonene bioconverted products	
C. Citron oil bioconverted products	

5. GC-sniffing of bioconverted products	63
A. GC-sniffing test	
B. Limonene bioconverted products	
C. Citron oil bioconverted products	
Section 4. Cloning of citron oil degrading pathway genes	69
1. Characterization of citron oil degrading pathway genes from the transformants	69
A. DNA manipulation	
B. Screeing of transformants	
2. Characterization of clones	70
A. Plasmid from transformnats	
B. Restriction enzyme mapping of plasmid	
C. Southern blot analysis	
Section 5. Biotransformation	76
1. Growth of <i>E. coli</i> transformants on M9 salts supplement with citron oil	76
2. Bioconversion	81
Section 6. Optimum process of useful bioconverted products	99
1. Single and associative culture	99
2. Bioconversion of citron oil by associative culture	102
Chapter 3. Isolation and application of citron essential oil and functional materials	125
Section 1. Introduction	125
Section 2. Extraction of citron oil from pressed citron peels	128
1. Pretreatments of pressed citron peel	128
2. Extraction by solvents	128

3. Extraction by CO ₂ supercritical	129
4. Extraction by steam distillation	129
5. Optimization of extraction process	132
Section 3. Characteristics of citron oil compounds by extraction methods	134
1. Analysis of essential oils by extraction methods	134
2. Determination of impact aroma in citron oil	139
3. Analysis of extraction methods	142
Section 4. Isolation and characterization of pectin	144
1. Optimization of pectin extraction conditions	144
2. Physiological and chemical properties of pectin	152
Section 5. Extraction of dietary fiber from pressed citron peel	161
1. Conditions of dietary fiber extraction	161
2. Analysis of dietary fiber	161
Section 6. Functional aroma soap by citron oil	168
1. Demonstration of samples: natural aroma soap	168
Section 7. Functional study of dietary fiber	175
1. Effect of dietary fiber on weight gaining rate	175
2. Effect of dietary fiber on lowering blood cholesterol level ..	179

목 차

제 1 장 서론	29
제 1 절 연구개발의 필요성	29
1. 기술적 측면	29
2. 경제, 산업적 측면	30
3. 사회, 문화적 측면	33
제 2 절 연구개발의 목적과 범위	34
1. 연구개발의 목적	34
2. 연구개발의 범위	36
제 2 장 생물공학 기법을 이용한 폐유자껍질로부터 유자정유 성분의 생전환	37
제 1 절 서설	37
제 2 절 유자정유 대사능 미생물의 개발(유용미생물의 자원화).....	39
1. 유자과피로부터 유자정유성분의 생전환능을 지닌 미생물의 분리 및 동정	39
2. Limonene의 toxicity test	39
3. 성장과 생전환(bioconversion of limonene).....	40
제 3 절 분리·동정된 균을 이용한 고부가가치 향기물질 생산.....	44
1. 미생물 배양액으로부터 향기성분추출.....	44
2. 분리균주가 생산한 향기성분의 관능검사.....	44
가. 관능검사(Total sniffing test)	
3. 유자정유 배지에서 <i>Enterobacter agglomerans</i> 6L 성장곡선.....	47
4. 생전환된 물질의 GC-MS를 통한 분석.....	48
가. GC-MS(성분분석)	
나. Limonene 대사산물 분석	
다. 유자정유 대사산물 분석	

5. 생전환된 물질의 GC-sniffing을 통한 분석.....	63
가. GC-sniffing test(향 분석)	
나. Limonene생전환 향기물질 분석	
다. 유자정유생전환 생산된 향기물질 분석	
제 4 절 유자정유 대사능 유전자의 확보(유용유전자의 자원화).....	69
1. <i>Enterobacter agglomerans</i> 6L로부터 유자정유 대사능을 지닌 유전자의 클로닝.....	69
가. DNA조작	
나. 형질전환주의 선별	
2. 형질전환주가 지닌 유전자의 분석.....	70
가. 형질전환체로부터 유전자의 확인	
나. 클로닝된 DNA의 제한효소지도 작성	
다. Southern blot analysis	
제 5 절 Biotrasformation: 형질전환주로부터 유자정유의 생전환.....	76
1. 균의 생육: 액체배지(M ₉ 최소배지)에서의 성장곡선.....	76
2. 생전환(bioconversion): 고부가가치 향기물질의 생산.....	81
가. 37°C, 6-60시간 배양 혼합물의 분석	
나. 28°C, 생육시기에 따른 생전환 화합물의 분석	
제 6 절 유용 향기성분의 최적생산공정 확립.....	99
1. 단독배양과 공동배양.....	99
2. 공동배양에 의한 유자정유의 생전환.....	102
제 3 장 폐유자박으로부터 정유 및 기능성 물질의 분리.....	125
제 1 절 서설.....	125
제 2 절 폐유자박으로부터 정유 성분의 추출.....	128
1. 유자박의 전처리.....	128
2. 용매에 의한 추출.....	128

3. 초임계 추출에 의한 추출.....	129
4. 증류에 의한 추출.....	129
5. 정유 추출조건의 최적화.....	132
제 3 절 추출방법에 따른 유자 정유성분의 특성.....	134
1. 추출공정에 따른 정유성분의 분석.....	134
2. 유자 정유의 주향성분의 결정.....	139
3. 추출방법의 장단점 비교.....	142
제 4 절 펙틴물질의 분리 및 특성 연구.....	144
1. 추출조건의 최적화.....	144
2. 펙틴의 물리화학적 특성.....	152
제 5 절 유자박으로부터 식이섬유의 제조.....	161
1. 식이섬유 제조 조건.....	161
2. 식이섬유의 분석 및 제조.....	161
제 6 절 유자정유를 이용한 기능성 향미누의 제조.....	168
1. 천연 향미누의 제조.....	168
제 7 절 식이섬유의 혈중 콜레스테롤 저하기능 분석.....	175
1. 체중 증가에 미치는 식이섬유의 효과.....	175
2. 유자 식이섬유가 혈중 콜레스테롤 함량에 미치는 영향.....	179

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

유자는 신맛이 강하고 향기가 고상하기 때문에 차등의 음료에 이용이 되어져 왔으며, 유자에 함유된 각종 성분은 건강식품으로서의 약리 효과가 뛰어나고, 유자청과이용, 유자 과육 이용 및 유자씨의 이용 등 다양한 제품개발 잠재력을 지니고 있다. 그 성분상으로 평가하였을 때에도 비타민 A와 C의 함량이 풍부할 뿐만 아니라, 유자의 껍질에 다량 존재하는 정유 성분인 리모넨(limonene)은 향기와 더불어 항균 작용도 갖고 있기 때문에 그 이용 범위가 매우 넓다. 그러나 현재의 우리 나라 유자 가공기술수준은 병조림과 유자주스 이외에 소비자의 다양한 기호를 충족시킬만한 단계에 이르지 못하고있는 실정이다. 이는 기존의 유자 생산 및 가공업체가 영세한 데 가장 큰 원인이 있겠으나, 유자가공업자들도 기술개발보다는 제조기술의 난이도가 적고, 쉽게 제조할 수 있는 품목, 예를 들면 유자차, 유자주스 등의 가공품만을 생산한데에도 그 원인을 찾을 수 있다. 현재 우리 나라의 유자 가공율은 전체 생산 유자의 약 20% 정도만이 가공되고 있고, 가공제품도 다양하지 못할 뿐더러 부가가치 또한 낮은 실정이다. 그리고 일부 유자는 가공의 형태가 아닌 착즙상태로 제조되어 출하되고 있다. 이 경우 유자의 착즙수율은 10-15%내외로, 중량으로 판단할 때 약 90%정도의 과육 및 과피가 부산물로 남게 된다. 이와 같은 폐유박내에는 식이섬유를 함유하고 있어 식이섬유원으로 전환이 가능하며, 유자 특유의 향을 결정하는 많은 정유성분이 함유되어 과피의 건조중량으로 환산했

을 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 95%정도를 차지한다. 이는 저렴한 가격으로 손쉽게 구할수 있는 terpene류로서, 많은 식품이나 그 밖의 향료산업에 직접 이용되어 질 수 있다. Limonene으로부터 얻을 수 있는 유용한 생전환 화합물로는 perillyl alcohol, perillyl aldehyde, perillic acid 그리고 α -terpineol 등을 들 수 있다. 이들은 천연적으로도 감귤류나 깻잎의 porilla oil 등에 미량 함유되어 있으며 식품이나 의약품등의 향기나 향 미생물 화합물로 쓰여지고 있다. 그러나 현재 이용되고 있는 대부분의 이들 화합물은 화학적인 방법에 의하여 합성되고 있다. 그러므로 유용한 이들 황합물을 생물공학적인 방법을 이용하며 생물학적으로 생산하려는 노력들이 이미 선진 외국에서는 시도되고 있다.

2. 경제. 산업적 측면

유자는 15°C 전후부터 해양성 기후에서 재배되어 우리 나라의 일부 남부지방과 일본에서 생산된다. 유자는 그의 고유한 특성 때문에 저장이 어려워 연중 생과로 거래되기 어려운 작물이다. 유자재배 농가들에 종가수취가격을 높이고 소득을 안정시키기 위해서 생과상태로의 제한된 물량의 소비보다는 유자가공이나 생물학적인 생전환에 의한 고부가가치 유자관련 물질의 창출이 필수적이다.

일본의 유자재배 현황을 보면 1980년 이후 꾸준히 증가 추세이며 1980년 대비 1992년 증가율은 209.9%이다. 1992년도 현재 일본의 유자 소비 실태를 용도별로 살펴보면 전체 생산량 13.045M/T 중 가공용이 49.9%, 청과용이 42.5%, 및 기타가 7.6% 등으로, 우리 나라가 가공용보다는 생과를 많이 소비하는 것

으로 대조를 이루고 있다(전남 발전 연구원, 1995). 유자에 관한 한 경쟁상대 국인 일본은 우리나라보다 훨씬 다양한 가공법이나 용도개발이 이루어져 있는 형편이다. 미국에서는 감귤류에 속하는 오렌지가 미국남부 플로리다 주에서 연중 생산되며 전 미국 생산의 그 대부분을 차지하고 있다. 오렌지는 정유성분이 되는 껍질 부분을 폐기처리 되므로 환경오염 등의 문제가 되고 폐자원의 이용차원에서 오렌지 껍질의 정유성분의 95%정도를 차지하는 limonene류의 monotepenes 화합물의 미생물학적 생전환에 의한 고부가가치 향기 물질 생산에 관해 여러 연구보고들이 있으며, 이것이 산업화되었을 때의 소유권 분쟁을 차단하기 위하여 이에 국제 특허등록 등을 마친 상태이다. 현재도 이 분야에 관한 연구가 진행중이며 그 고부가가치를 고려할 때 꾸준히 연구 개발이 이루어 질 것이다.

국내현황을 살펴보면, 유자는 특유의 고상한 향으로 초기에는 식용보다는 관상용으로 재배되어 소량씩 출하되었으나 유자가 함유한 풍부한 비타민 C, 구연산 등의 영양학적인 측면과 유자의 향 그리고 유자의 가격이 다른 일반 과일에 비하여 상대적으로 높은 수익성(표1)을 보장하기 때문에 최근에는 재배농가가 급격하게 증가하여 이에 따른 유자 출하량도 많아지고 있는 실정이다. 전국의 유자 재배 동향을 재배면적을 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 재배기술의 향상으로 재배면적의 증가율보다 빠른 증가율을 보이는데 1994년도 유자 총 생산량은 12,542M/T 이고 95년도에는 14,000M/T, 1999년도에는 19,000M/T 그리고 2004년도에는

23,000M/T에 이를 것으로 추정하고 있다.

우리나라의 최근 유자생산량과 가공량 실적을 살펴보면 1987년도에는 유자 생산량의 80.2%가 생과로 출하되었고 19.8%가 가공출하 되었으며, 1989년도에는 유자 생산량의 96.4%가 생과로 출하되었는데 비하여 가공출하는 3.6%에 불과하였다. 그러나 가공 방법 면에서는 1987년도에는 통조림에 집중되었으나 1989년도에는 유자쥬스, 유자차, 통조림 등으로 점차 다양화되었으나 일본의 가공법에 비하면 상당히 국한된 방법임을 알 수 있다(표 2). 유자가공량에 대한 통계는 1989년도 이후 나타나 있지 않은 관계로 정확히 알 수는 없지만 대략 20%정도가 되는 것으로 추론 할 수 있고, 이를 일본의 유자 가공과 비교하여 보면 우리의 현재 유자 가공을 및 가공제품은 향후에 부단히 개발되어야 할 것으로 판단된다.

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, 1997년도의 경우를 보면 유자의 생산량은 기후적인 조건과 영농의 다각화로 증가한 반면, 적당한 가공기술의 부재 및 유자에 대한 홍보 부족 등으로 수요와 공급을 초과하여 한차례 유자가격의 하락으로 파동을 겪은바 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 그리 밝은 편이 아니다. 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 생물공학적 기법을 도입하여 수요개발에 전력해서 지역전체의 부가가치를 높여나가는 것이 유자농가의 활로를 열어주는 길일 것이다.

3. 사회·문화적 측면

일본인의 유자에 대한 인식은 한국인처럼 차나 건강식품으로 생각하기보다는 음식에 필요한 조미료로 인식되고 있어 유자가 조미료 가공품으로 제조되어 일찍부터 소비자에게 유통되고 있으며, 목욕을 즐기는 일본인의 풍습에 따라 유즙으로(목욕탕의 향료로 사용되는 유자)로서도 널리 이용되어 우리나라보다 유자의 소비패턴이 다양함을 알 수 있다.

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 국제적 실정에 비하여 우리나라에서는 유자의 소비를 다양하게 하기 위한 1차 가공 부문에만 국한되어 있다. 그러므로 새로운 가공 제품의 개발 및 고부가가치 상품을 창출한다는 것은 반드시 우리 해결해야 될 과제라고 생각된다. 본 연구과제는 유자가공 시에 발생하는 폐 자원을 활용한다는 사회적 측면과 퇴비화 등이 어려운 물질을 정제함으로써 환경문제를 해결한다는 환경 친화적인 측면도 가지고 있다.

제 2 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적

본 연구는 전남지역 및 남해안 일대의 특산품인 유자의 1차 가공시 부산물로 발생하는 거의 폐자원의 형태로 다량의 과육 및 과피부산물을 이용하여 고부가가치 제품의 제조 기술 개발과 동시에 유자에 함유된 풍부한 정유성분을 생물공학적인 기법을 이용하여 고부가가치의 새로운 화합물을 창출하고자 한다.

현재 유자는 그 생산량의 20%정도만 가공이 되어 출하되고 있으며, 가공제품도 대부분이 유자차, 유자주스 그리고 유자잼이 주종을 이루고 있다. 그리고 유자의 저장상의 문제점 때문에 상당량의 유자가 착즙 후 착즙액의 상태로 보관되어 출하 또는 수출되고 있다. 이때 그 수율이 10% 안팎이므로 유자착즙 후 90% 이상의 과피 및 과육이 부산물로 남게된다. 이러한 착즙 후의 부산물로 생기는 유자의 과피 및 과육을 퇴비화 시켜 사용하려고 하고 있는 시도가 있으나, 이를 부산물에 다량 함유되어 있는 정유성분은 어느 일정 농도 이상에서는 미생물의 번식을 억제하므로 퇴비화 시키는데 많은 어려움이 있다. 그리고 퇴비화 시킨다해도 새로운 유자제품이나 농가소득의 증대 차원에서는 크게 기대할 수가 없다. 유자의 과피에 다량 함유된 정유성분(limonene등의 monoterpenoid 화합물들)은 퇴비나 사료화 할 경우에는 과피의 건조를 어렵게 하기 때문에 좋지 않은 영향을 미치나, 이들 정유성분은 정제되면 고가의 원료로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 유자 특유의 향을 함유하고 있으므로 식품 및 의약품 등에 이용할 수 있으며 과육 부분은 다른 citrus 과일에 비하여 두꺼워 많은 펙틴 등의 식이 섬유를 함유하고 있으므로 식이 섬유원으로서의 전환이 가능하다. 또한 일부 정유성분은 미생물 이용한 bioconversion을 통하여

새로운 향기 성분으로의 전환이 가능하기 때문에 원료물질에 비하여 매우 부가가치가 높은 물질 창출을 기대할 수 있다.

본 연구과제의 단계별 과정을 간략히 정리하면 다음과 같다.

첫째, 유자착즙공정후에 생기는 폐유자박으로부터 정유성분 및 과육에 함유된 식이 섬유를 분리

둘째, 유자에 있는 limonene 등의 monoterpenoid 화합물들을 생물공학적인 기법을 도입하여 고부가가치의 향기물질을 생산할 수 있는 미생물의 screening 과 그 유전자의 확보 및 process 개발

셋째, 위와 같은 방법에 의하여 생산된 여러 유자의 유용성분을 이용하여 기능성 식품, 여러 향제품(향수, 비누)의 개발

현재 유자 가공의 부산물로 버려지거나 퇴비화되어 사용되어지는 유자의 과피 및 과육을 이용하여 고부가가치의 정유성분 및 식이 섬유를 분리 정제하여, 기능성 식품 재료 및 향제품을 개발하려한다. 동시에 자원화 할 수 있는 유용 미생물 및 유전자를 개발하여 폐자원으로 버려지고 있는 폐유자박의 유자정유를 고부가가치 정유성분으로 생전환시키는 미생물 시스템 구축을 연구 목적으로 하고 있다. 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 있을 것으로 판단된다.

2. 연구개발의 범위

○ 자원화 할 수 있는 유용 미생물 및 유전자의 개발

- 폐유자과피내의 정유성분을 이용할수 있는 미생물 탐색
- 유자정유성분 분해능 유전자의 확보
- 형질전환주로부터 유자정유의 생전환
- 유용향기 성분의 최적생산 공정확립

: 유자정유 대사능 형질전환주들의 공동배양에 의한 유자정유 생전환

○ 폐유자박을 이용한 정유가공품 및 기능성식품 개발

- 폐유자박의 정유성분의 추출
- 유자박으로부터 펙틴 물질의 분리 및 특성 연구
- 유자정유성분 및 식이섬유로부터 시제품 제작
- 유자 식이섬유의 기능성 분석(동물실험)

제 2 장 생물공학 기법을 이용한 폐유자껍질로부터 유자정유 성분의 생전환

제 1 절 서 설

유자에는 비타민 A, C등의 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 화합물로서 유자나 오렌지와 같은 감귤류 껍질 정유성분의 공통적인 주요성분이며 과일 내 정유성분의 약 70-95%정도를 차지한다. 이는 저렴한 가격으로 손쉽게 구할 수 있는 terpene 류로서, 많은 식품이나 그 밖의 향료산업에 직접 이용되어 질 수 있을 뿐만 아니라 미생물의 대사체계를 이용하여 값비싼 다른 향기물질로 전환시킬 수 있는 초기 기질물질로 이용될 수 있다. 유자 정유성분 중의 중요한 향기성분은 *d*-limonene, γ -terpinene, linalool, camphene, myrcene 그리고 phellandrene 등이 있으며 이들로부터 얻을 수 있는 유용한 생전환 화합물로는 perillyl alcohol, perillylaldehyde, α -terpineol, nerol, cryptone, γ , δ -valerolactone, hydroxycitronellol, cuminol 등이 있다. 이들 향기물질은 천연적으로 감귤류 뿐 아니라 각종 식물체의 꽃, 씨, 잎, 줄기, 뿌리, 껍질 등에 미량씩 함유되어 있으며 식품뿐만 아니라 의약품, 향장산업 등에 널리 쓰여지고 있다.

그러나 미생물에 의한 향기물질의 생전환에 관한 연구와 많은 관심에 비해 아직 상업적수준에 달하는 어떠한 성과도 없다. 그 원인으로는 limonene이나

그 대사산물이 대부분의 미생물에 대해 독성을 지니고 있기 때문이다. 지금까지 몇몇의 연구자들에 의해 limonene과 같은 terpenoid 화합물들을 대사할 수 있는 미생물을 분리하고 이로부터 생전환되는 대사산물을 동정하여 보고한 바 있다. 그러한 연구들에서의 문제점은 정유성분이 지니는 미생물에 대한 강한 독성 때문에 높은 농도로 기질인 정유성분을 첨가할 수 없는 것이다. 정유성분만을 유일한 에너지 대사원으로 첨가시 미생물의 낮은 기질 이용능에 따라 충분한 양의 미생물 세포 생장이 이루어지지 않는다. 따라서 배지 내에 반드시 추가적인 영양물을 공급해야 정유성분을 생전환시킬 수 있는 적정 수준의 형질전환주 미생물 세포 생장을 얻을 수 있다는 것이다. 즉 limonene을 비롯한 terpenoid 화합물들의 미생물에 대한 독성은 낮은 미생물 세포 생장을 일으키고 이로 말미암아 terpenoid 화합물들의 낮은 생전환율에 의해 유효한 생전환 대사산물의 생산량이 몹시 낮다는 것이다. 그러므로 성공적인 유자정유 생전환을 위해서는 limonene이나 이르 포함한 terpenoid 화합물에 대한 강력한 저항성과 이들 기질 물질을 유일한 탄소원으로 하는 배지에서 높은 세포성장을 이룰 수 있는 유자정유 대사능이 우수한 미생물 개발이 필수적인 선행사항이다.

본 연구에서는 유자정유 성분을 대사 할 수 있고 정유성분의 독성에 강한 내성을 지니며 유자정유가 유일한 배지에서 어떠한 영양물의 추가적인 공급 없이도 적정 수준의 세포성장을 보이는 미생물을 개발하고 이로부터 유용유전자(유자정유 대사능)를 확보하고자 한다. 즉 자원화 할 수 있는 유용미생물 및 유전자를 개발하고 이로부터 폐자원으로 버려지고 있는 유자껍질에서 유자정유를 고부가가치의 정유성분으로 생전환시키는 미생물대사시스템을 구축하고자 하였다.

제 2 절 폐유자정유성분의 대사능을 지닌 미생물의 개발(유용 미생물의 자원화)

1. 유자과피로부터 유자정유성분의 생전환능을 지닌 미생물의 분리 및 동정

유자정유성분의 대부분(약 70~90%)을 limonene이 차지하므로 limonene을 가한 집적배양(enrichment culture)에 의하여 유자껍질로부터 limonene을 대사 할 수 있는 수종의 미생물을 분리하였다. 분리된 미생물들은 배지에 유일한 탄소원으로 limonene을 이용할 수 있는지 재검증하기 위하여 DP나 M₉ 최소 배지에 분리균주를 접종하고 기체상태로 limonene을 공급하면서 그 성장을 고체 및 액체배양을 통하여 확인하여 최종 3종을 분리하였다(6L, 6S, 15). 분리균주의 동정을 위한 그람염색법 및 현미경관찰 결과 3종의 균주(6L, 6S, 15) 모두 그람음성의 간균이었다. Microstation system을 통하여 생리·생화학적 특성을 분석하여 Table 1에 나타내었다. 위 결과로부터 6L은 *Enterobacter agglomerans*, 6S는 *Xanthomonas maltophilia*, 15는 *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*로 각각 동정되었다.

2. Limonene의 toxicity test

Limonene은 대부분의 미생물에 대하여 살균, 정균작용이 있으므로 분리균주의 limonene에 대한 저항능을 알아보기 위하여 0 - 5%(v/v)의 limonene을 LB 액체배지에 직접 가하여 그 성장정도를 A₆₀₀에서 혼탁도로 측정하였다. 이때 대조구로 *E. coli*를 동일한 조건에서 같이 실험하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 3종의 분리균주 모두 대조구인 *E. coli*에 비하여 limonene에 대한 높

은 저항성을 나타냈으며, 특히 6L은 5%의 limonene에서도 높은 성장율을 나타내어 강력한 저항능을 나타내었다.

3. 성장과 생전환(bioconversion of limonene)

분리된 미생물을 M₉ 최소배지에서 유일한 탄소원으로 limonene을 기체 상태로 지속적으로 공급하면서 28℃에서 진탕배양하였다. 미생물의 성장곡선을 A₆₀₀에서 측정하여 분리균종간의 성장정도를 비교하였다(Fig. 2). Limonene을 유일한 탄소원으로 한 최소배지에서 3종의 균주 모두 매우 높은 성장율 (A₆₀₀=3.0~4.5)을 나타내어 limonene 대사능이 매우 우수하여 기존의 보고들에서 보다 수십배 높은 대사능을 나타내었다. 배양이 끝난 미생물 배양액은 이후의 추출공정에 의해 생전환된 대사산물의 분석 시료로 사용하였다.

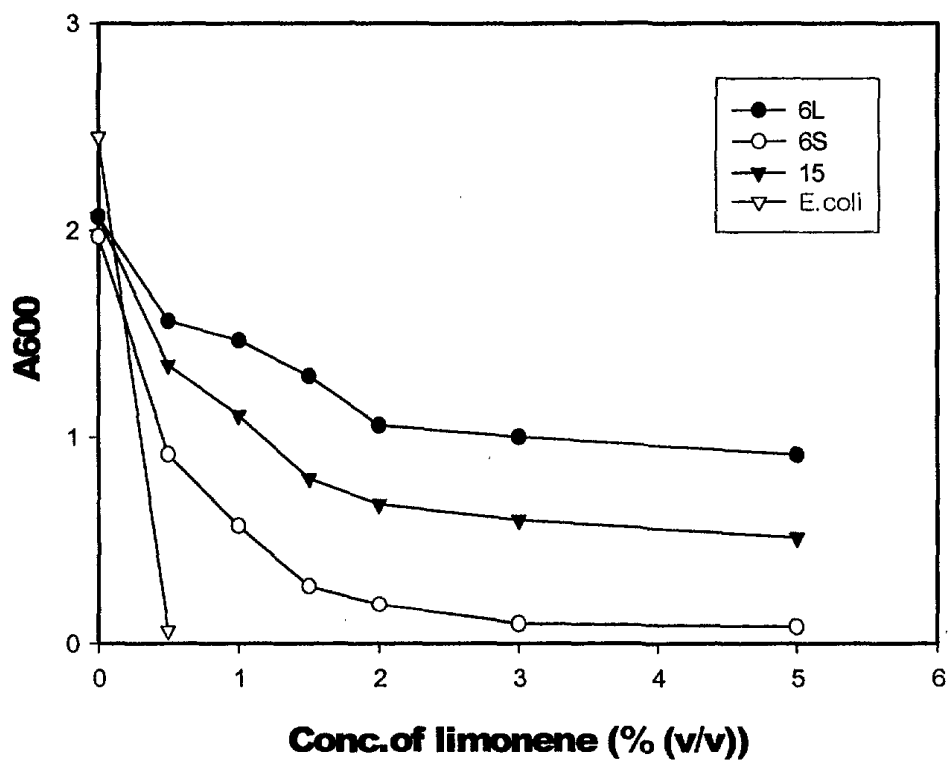


Figure 1. Growth inhibition by (+)-limonene of three isolated 6-L, 6-S and 15, *E. coli* was tested as a control.

Table 1. Metabolic fingerprints of isolated microorganisms 6L, 6S and 15

Metabolic Characteristics	6L	6S	15	Metabolic Characteristics	6L	6S	15
Water	-	-	-	p-hydroxy phenylacetic acid	-	-	+
α -cyclodextrin	-	-	?	itaconic acid	-	?	-
dextrin	+	+	+	α -keto butyric acid	-	+	-
glycogen	+	+	+	α -keto glutaric acid	-	+	+
tween40	+	+	+	α -keto valenic acid	-	+	-
tween80	+	+	+	D,L-lactic acid	+	+	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	+	+	Malonic acid	-	+	?
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	+	Propionic acid	-	?	+
adonitol	+	-	+	Quinic acid	+	?	+
L-arabinose	+	-	+	D-saccharic acid	-	?	-
D-arabitol	+	-	+	Sebacic acid	+	+	+
cellobiose	+	+	+	Succinic acid	+	+	+
i-erythritol	+	-	?	Bromo succinic acid	+	+	+
D-fructose	+	+	+	Succinamic acid	?	+	+
L-fucose	+	-	+	Glucuronamide	+	?	+
D-galactose	+	-	+	Alaninamide	-	+	+
gentiobiose	+	+	+	D-alanine	+	+	+
α -D-glucose	+	+	+	L-alanine	+	+	+
m-inositol	+	-	+	L-alanyl-glycine	+	+	+
α -D-lactose	+	+	+	L-asparagine	+	+	+
lactulose	+	+	+	L-aspartic acid	+	+	+
maltose	+	+	+	L-glutamic acid	-	+	+
D-mannitol	+	-	+	Glycyl-L-aspartic acid	+	+	+
D-mannose	+	+	+	Glycyl-L-glutamic acid	+	?	+
D-melibiose	+	+	+	L-histidine	-	?	-
β -methylD-glucoside	+	+	+	Hydroxy L-proline	-	+	-
D-psiocose	+	-	+	L-leucine	-	+	-
D-raffinose	+	?	+	L-ornithine	-	+	+
L-rhamnose	+	-	+	L-phenylalanine	+	+	+
D-sorbitol	+	-	+	L-proline	-	?	?
sucrose	+	+	+	L-pyroglutamic acid	-	-	+
D-trehalose	+	+	+	D-serine	+	+	+
turanose	?	+	+	L-serine	+	+	+
xylitol	+	?	+	L-threonine	-	?	-
methyl pyruvate	+	+	+	D,L-camitine	-	-	-
mono-methyl succinate	+	+	+	γ -amino butyric acid	-	-	+
acetic acid	+	?	+	urocanic acid	+	+	+
cis-aconitic acid	+	+	+	inosine	+	+	+
citric acid	+	+	+	uridine	+	+	+
formic acid	+	+	+	thymidine	+	?	+
D-galactonic acid lacton	+	-	+	phenyl ethylamide	-	-	-
D-galacturonic acid	+	?	+	putrescine	-	-	+
D-gluconic acid	+	?	+	2-amino ethanol	-	-	+
D-glucosaminic acid	-	-	+	2,3-butanediol	-	?	-
D-glucuronic acid	+	?	+	glycerol	+	?	+
α -hydroxybutyric acid	?	+	?	D,L- α -glycerol phosphate	+	?	+
β -hydroxybutyric acid	-	+	+	Glucose-1-phosphate	+	?	+
γ -hydroxybutyric acid	-	?	-	Glucose-6-phosphate	+	-	+

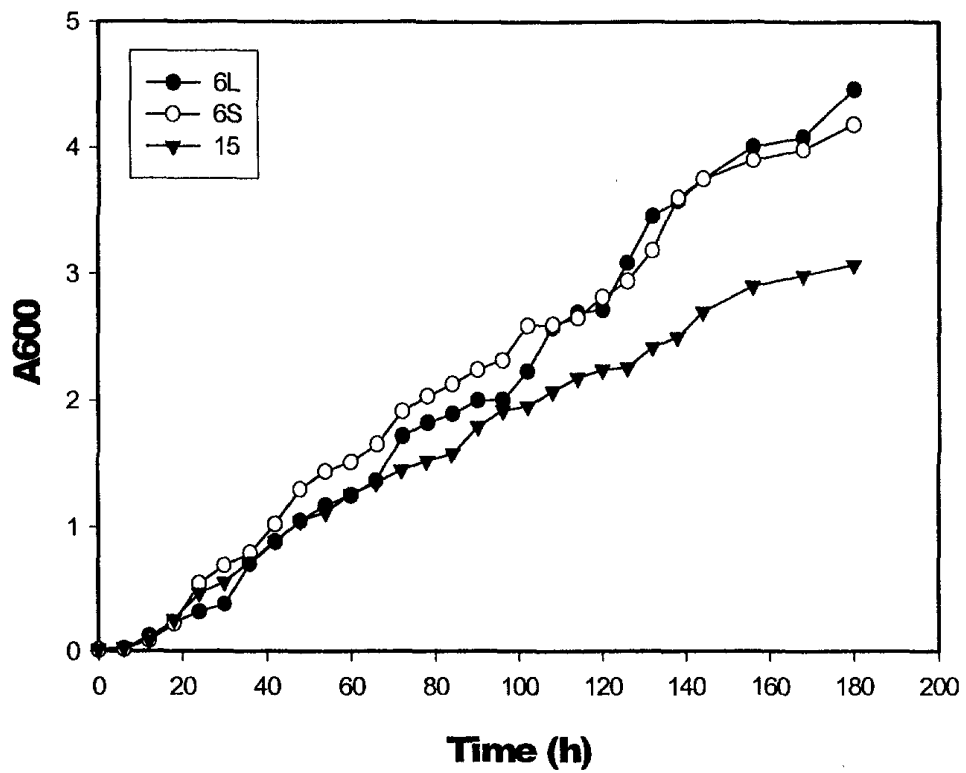


Figure 2. Growth of three isolated microorganisms in M₉ minimal media with limonene as a sole carbon source.

제 3 절 분리·동정된 균을 이용한 고부가가치 향기물질 생산

1. 미생물 배양액으로부터 향기성분 추출

유자정유나 limonene을 유일한 탄소원으로 하는 배지에서 배양이 종료된 미생물 배양액은 12,800 ×g에서 20분간 4℃에서 원심분리하여 상정액을 취하였다. 얻어진 상정액은 Millipore 0.45μm filter로 여과하여 완전 제균하였다. 준비된 상정액은 ether로 추출하였으며 필요에 따라 산성 및 중성 분획으로 나누었고 최종 추출 분획은 N₂ stream으로 농축하여 GC-sniffing 및 GC-MS 분석용 시료로 준비하였다.

2. 분리균주가 생산한 향기성분의 관능검사

가. 관능검사(Total sniffing test)

미생물 배양액으로부터 준비된 GC 분석 직전의 모든 시료는 1μl씩 취하여 olfactory test(sniffing test)를 통하여 추출물의 전체적인 향에 대한 관능검사를 시행하였다. 관능검사는 조선대학교 식품영양학과 대학원생, 학부생 10명으로 구성하여 시행하였으며, 개인의 주관적 기호를 배제하기 위하여 4명의 고정된 관능검사자와 6명의 유동적인 검사자가 시행하여 그 결과를 Table 2에 요약하였다. 추출분획에 따라 차이가 있었으나 대체로 6L이 부드러우나 강하게 느낄 수 있는 꽃향과 woody향을 나타내어 기호도가 가장 높았으며, 그 다음이 6S로 6L과 비슷한 꽃향이 있으나 소독약냄새가 깔려있었으며 15는

향긋한 냄새가 있기는 하나 소독약냄새가 강하고 화장실냄새와 같은 냄새가 있어 3종 중 가장 기호도가 낮았다. limonene에 대한 저항능, limonene 및 유자정유의 이용능, 미생물에 의해 생전환된 향기 성분의 관능검사 등의 총체적인 결과에 따라 6L을 유자정 유성분을 생전환(bioconversion)시켜 유용한 향기성분을 생산하는 균주로 최종 선정하였다.

Table 2. Sniffing test of the total flavor extracts from microbial metabolites(flavor compounds).

feeding 균주	limonene	유자정유
6-L	<ul style="list-style-type: none"> • Acidic fraction - 꽃향이 약하며, 소독약 냄새 • Neutral fraction - 꽃향, 상큼, 수박냄새, 시원 • Total fraction - 꽃향, 송진향, woody 계열 냄새 강함, 풀냄새 	<ul style="list-style-type: none"> • Acidic fraction - 약품냄새, 지독함 • Neutral fraction - 꽃향, 껌냄새, 수박냄새, 시원한 냄새 • Total fraction - 처음엔 코를 자극하는 냄새 → 점점 은은한 꽃향이 난다
6-S	<ul style="list-style-type: none"> • Acidic fraction - 소독약 냄새 • Neutral fraction - 15보다 약한 소독약냄새 	<ul style="list-style-type: none"> • Acidic fraction - 꽃향기 아주 약함, 약품냄새 • Neutral fraction - 꽃향기 상큼, 유자차향, 치약 냄새가 섞인 유자냄새
15	<ul style="list-style-type: none"> • Acidic fraction - 소독약 냄새 • Neutral fraction - 소독약 냄새 	<ul style="list-style-type: none"> • Acidic fraction - 화장실 냄새 • Neutral fraction - 풋사과향, 향긋하면서 acidic 냄새도 섞임

3. 유자정유 배지에서 *Enterobacter agglomerans* 6L 성장곡선

최종 선정된 *Enterobacter agglomerans* 6L을 M9 최소배지에서 유일한 탄소원으로 유자정유를 기체 상태로 지속적으로 공급하면서 28℃에서 진탕배양하였다. 성장곡선을 A₆₀₀에서 측정하여 120시간에 A₆₀₀=3.2라는 높은 성장률을 확인하였다(Fig. 3). 배양이 끝난 미생물 배양액은 이후의 추출공정에 의해 생 전환된 대사산물의 분석 시료로 사용하였다.

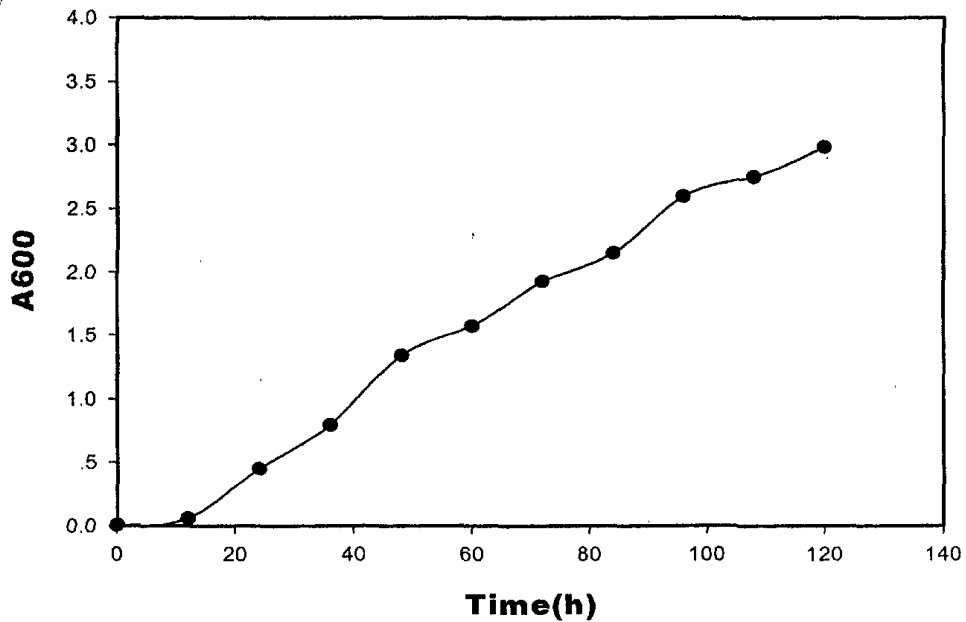


Figure 3. Growth of *Enterobacter agglomerans* 6L in M9 minimal medium with citron oil as a sole carbon source.

4. 생전환된 물질의 GC-MS를 통한 분석

가. 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

나. Limonene 대사산물 분석

Enterobacter agglomerans 6L이 limonene을 대사 하여 새로운 terpene화합물을 생산하는데 배양시간(12-24시간, 96시간, 120시간)에 따라서 대사산물의 종류와 양이 다르게 나타났다. 배양 12-24시간만에 초기정유성분이 대부분 사라졌다가 배양 96시간 경부터 미생물의 대사에 의해 생전환된 향기성분들이

생성되기 시작하였다. γ -Valerolactone은 96시간, 120시간 배양액에서 가장 많은 양이 검출되었다. Cryptone은 120시간 배양액에서 12-24시간 배양액보다 11.4배 96시간 배양액보다는 4.1배 높게 검출되었다. 120시간에서는 추출전의 배양액 내에서도 부드러운 꽃향 및 woody향을 느낄 수 있었다. *Enterobacter agglomerans* 6L이 limonene을 대사 하여 γ -Valerolactone과 Cryptone을 주요 대사산물로 생산함을 확인하였다. 이때 자동산화 등에 의한 성분변환과 미생물 대사에 의한 물질생산을 구분하기 위하여 동일한 조건에서 미생물을 넣지 않고 처리한 구를 대조구로 삼았다. 대조구의 추출 후 전체시료에서 limonene과 유사한 냄새가 났다. 대조구에서 12-24시간에는 처음에 가해준 limonene 정유성분이 그대로 존재하였고 시간이 지남에 따라(96-120시간) 휘발에 의한 조성상태 손실이 관찰되었다. 그러나 미생물 접종 배양액에서와 같은 생전환 생산물은 관찰되지 않았다. 이것으로 *E. agglomerans* 6L이 limonene을 대사하여 새로운 향기물질을 생산함을 확인 할 수 있었고 그 결과를 Fig. 4, 5, 6과 Table 3, 4, 5에 나타내었다.

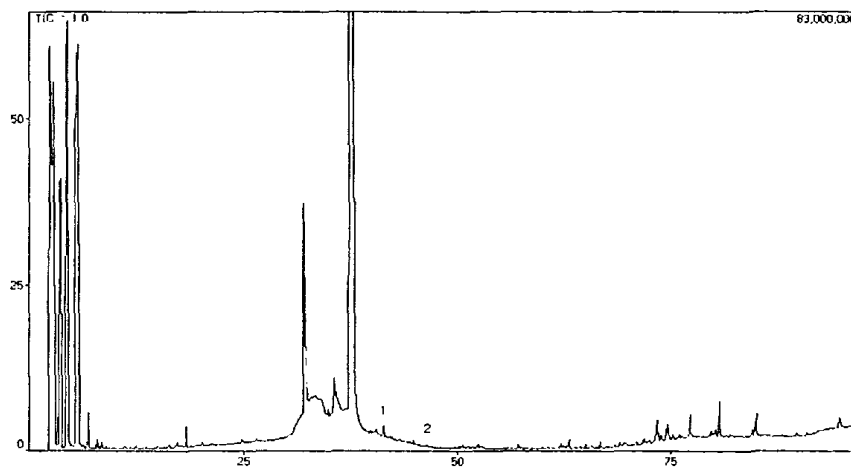
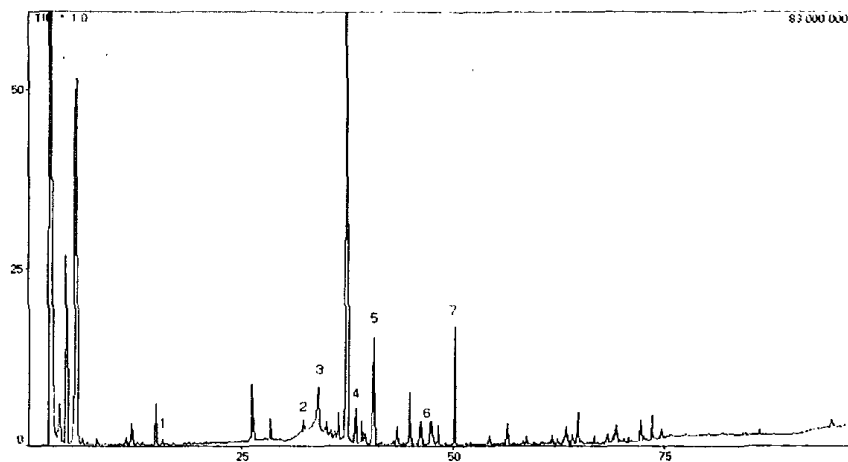


Figure 4. GC chromatograms of bioconverted products from limonene *Enterobacter agglomerans* 6L for 12-24h cultivation. Top: without microorganism & with limonene. Bottom: with microorganism & with limonene.

Table 3. Identification of the metabolites from the cultures with and without *E. agglomerans* 6L incubated in M9 minimal medium containing limonene as a sole carbon source for 12–24h.

- without 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	Limonene	15.792	1187	4,011,462
2	Acetic acid	32.308	1421	13,581,681
3	Copaene	34.133	1493	77,394,000
4	Linalool	38.542	1533	29,839,064
5	(E)-caryophyllene	40.592	1617	109,976,307
6	α -Terpineol	47.250	1655	4,754,484
7	δ -Cadinene	50.242	1761	135,700,959

- with 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	γ -Valerolactone	41.125	1617	9,342,717
2	Cryptone	44.925	1640.6	2,887,712

^{a)} RT: retention time

^{b)} RI: retention index

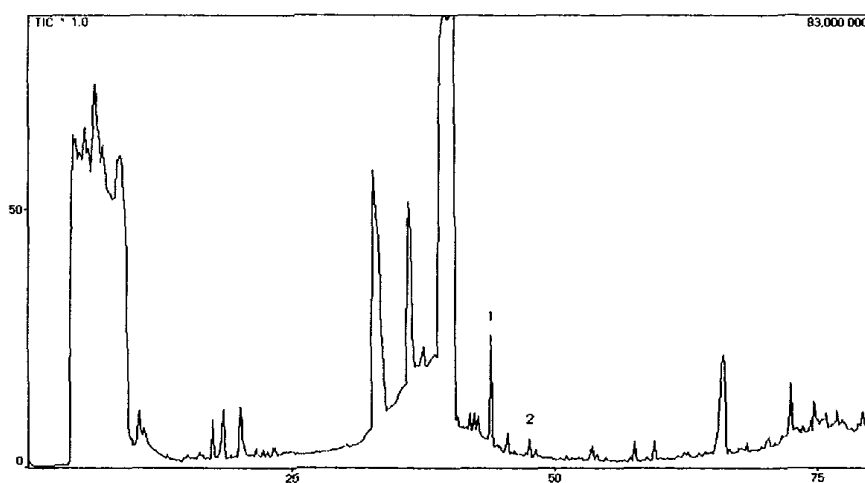
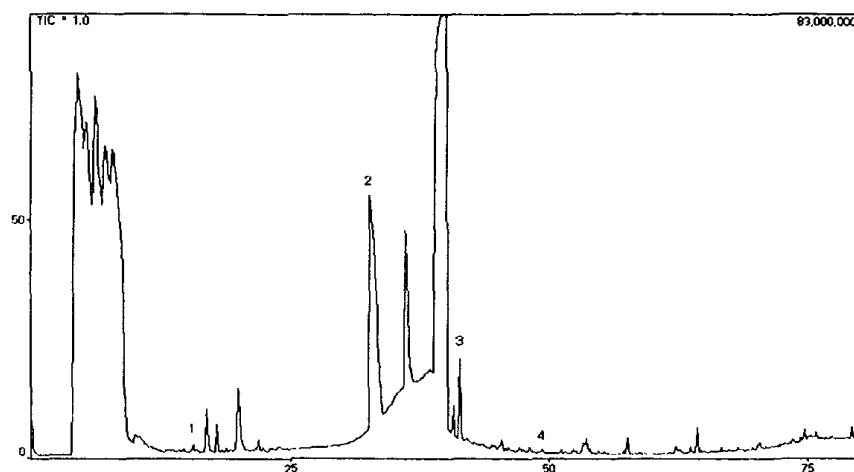


Figure 5. GC chromatograms of bioconverted products from limonene by *Enterobacter agglomerans* 6L for 96h cultivation. Top: without microorganism & with limonene. Bottom: with microorganism & with limonene.

Table 4. Identification of the metabolites from the cultures with and without *E. agglomerans* 6L incubated in M9 minimal medium containing limonene as a sole carbon source for 96h.

- without 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	limonene	17.224	1164.3704	14,050,141
2	Acetic acid	32.779	1407.2909	1,381,389,222
3	Linalool	40.664	1536.4861	20,363,011
4	α -Terpienol	49.4	1672.4201	3,071,287

- with 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	γ -Valerolactone	43.741	1581.0545	66,394,946
2	Cryptone	47.580	1643.2	8,694,010

^{a)} RT: retention time

^{b)} RI: retention index

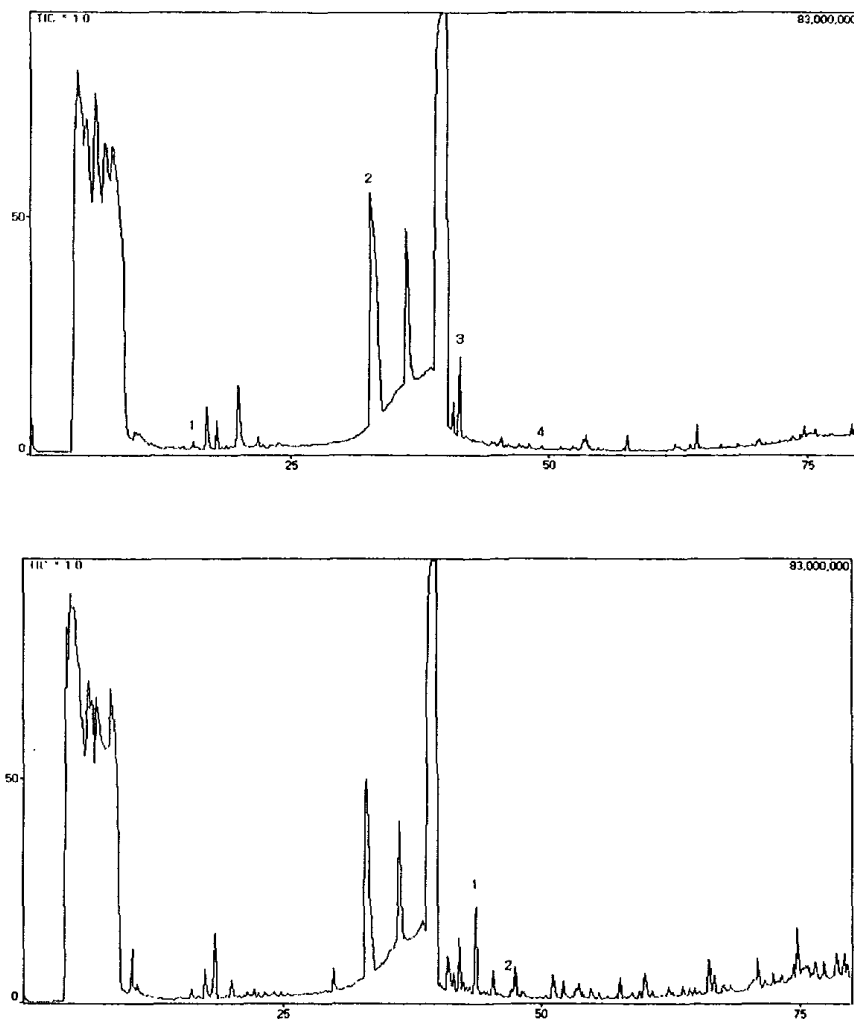


Figure 6. GC chromatograms of bioconverted products from limonene by *Enterobacter agglomerans* 6L for 120h cultivation. Top: without microorganism & with limonene. Bottom: with microorganism & with limonene.

Table 5. Identification of the metabolites from the cultures with and without *E. agglomerans* 6L incubated in M9 minimal medium containing limonene as a sole carbon source for 120h.

-without 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	limonene	15.758	1144.5438	7,540,646
2	Acetic acid	32.117	1404.8834	96,953,368
3	Linalool	38.525	1505.8507	54,206,674
4	α -Terpienol	47.208	1645.7042	7,405,772

- with 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	γ -Valerolactone	43.672	1583	63,842,185
2	Cryptone	47.467	1643.2	33,100,708

^{a)} RT: retention time

^{b)} RI: retention index

다. 유자정유 대사산물 분석

Enterobacter agglomerans 6L은 M9 최소배지에서 유일한 탄소원인 유자정유를 대사하여 새로운 terpenoid화합물을 생산한다. 탄소원으로 limonene만 공급했을 때 보다 각종 정유성분이 혼합된 유자정유를 미생물 생육 탄소원으로 이용하였을 때 보다 다양하고 많은 양의 향기성분이 검출되었고 배양 시간에 따라 대사산물의 종류와 양이 다르게 나타났다.

12-24시간에 대조구는 유자정유성분내의 monoterpenoid성분이 거의 그대로 검출되었지만 *Enterobacter agglomerans* 6L을 접종한 실험구에서는 유자정유내의 monoterpenoid성분들이 6L의 세포 내 에너지원으로 대부분 쓰여졌음을 알 수 있었다(Fig. 7, Table 6).

96시간 배양된 추출물에서는 trans-2-Decenal, Octanol, γ -Valerolactone, Cryptone, Cuminol, Hexadecanol, Hydroxycitronellol이 대사산물로 검출되었다(Fig. 8, Table 7). 이 기간에서는 부드러운 꽃향, 화한냄새, 송진 냄새가 났다.

120시간 배양된 추출물에서는 가장 높은 생산력과 많은 생전환 물질이 검출되었다. trans-2-Decenal, Octanol, γ -Valerolactone, Cryptone, α -Camphereral, δ -Valerolactone, Cuminol, Hexadecanol, δ -Cadinol, Hydroxycitronellol, γ -Dodecalactone가 이기간에 검출된 물질들이다(Fig. 9, Table 8). 이 기간에는 송진 향과 함께 기분 좋은 꽃 향이 약하게 깔려 있었다. 96시간과 120시간의 대조구에서는 12-24시간보다 물질이 적게 검출되어 오랜 배양시간동안 유자정유내의 물질들이 휘발되었음을 알 수 있었다.

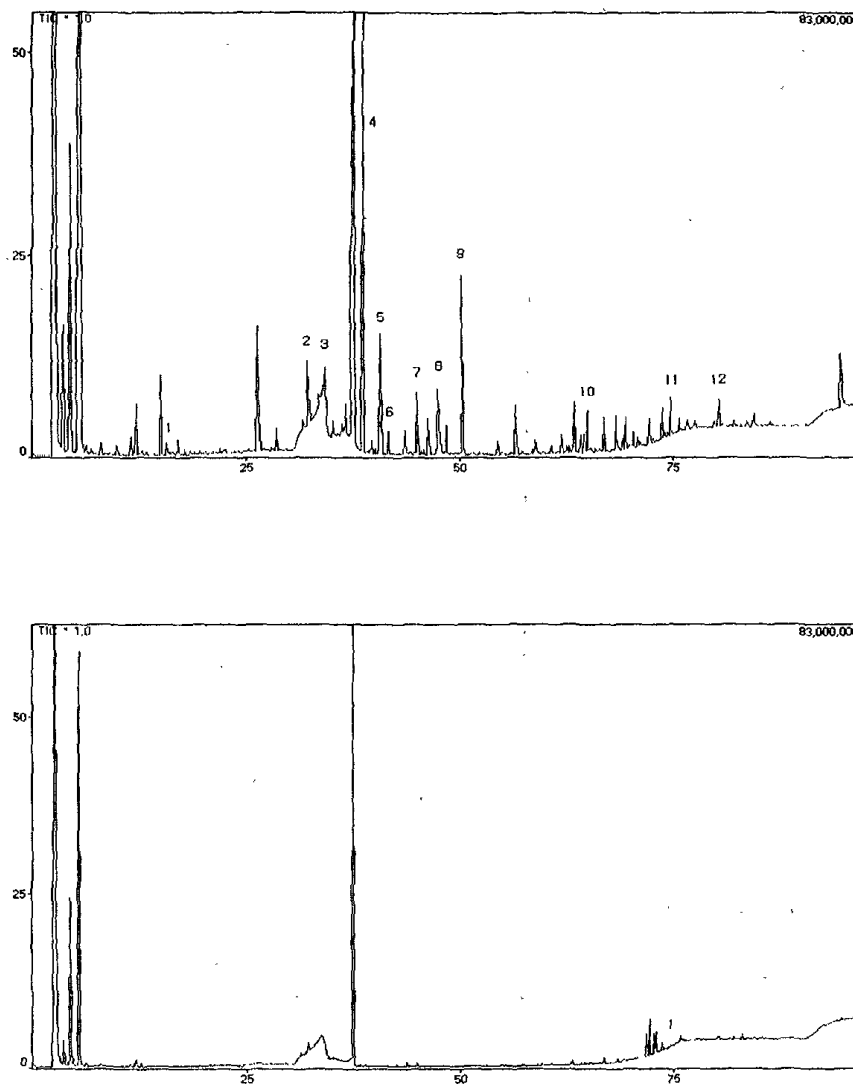


Figure 7. GC chromatograms of bioconverted products from citron oil by *Enterobacter agglomerans* 6L for 12-24h cultivation. Top: without microorganism & with citron oil. Bottom: with microorganism & with citron oil.

Table 6. Identification of the metabolites from the cultures with and without *E. agglomerans* 6L incubated in M9 minimal medium containing limonene as a sole carbon source for 12-24h.

- without 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	Limonene	15.858	1200	9,527,289
2	Acetic acid	32.292	1406.6	63,079,196
3	α -Copaene	34.258	1493	44,193,525
4	Linalool	38.700	1533	401,891,139
5	Caryophyllene	40.717	1617	117,090,335
6	4-Terpineol	41.600	1628	17,345,569
7	α -Humulene	44.975	1649	58,501,370
8	α -Terpineol	47.383	1655	20,756,782
9	δ -Cardinene	50.367	1761	197,097,134
10	Palustrol	65	2086	36,758,790
11	Hexadecanol	74.842	2376	25,980,605
12	Octadecanol	80.475	2530	25,556,589

- with 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	Hexadecanol	75.975	2376	5,722,069

^{a)} RT: retention time

^{b)} RI: retention index

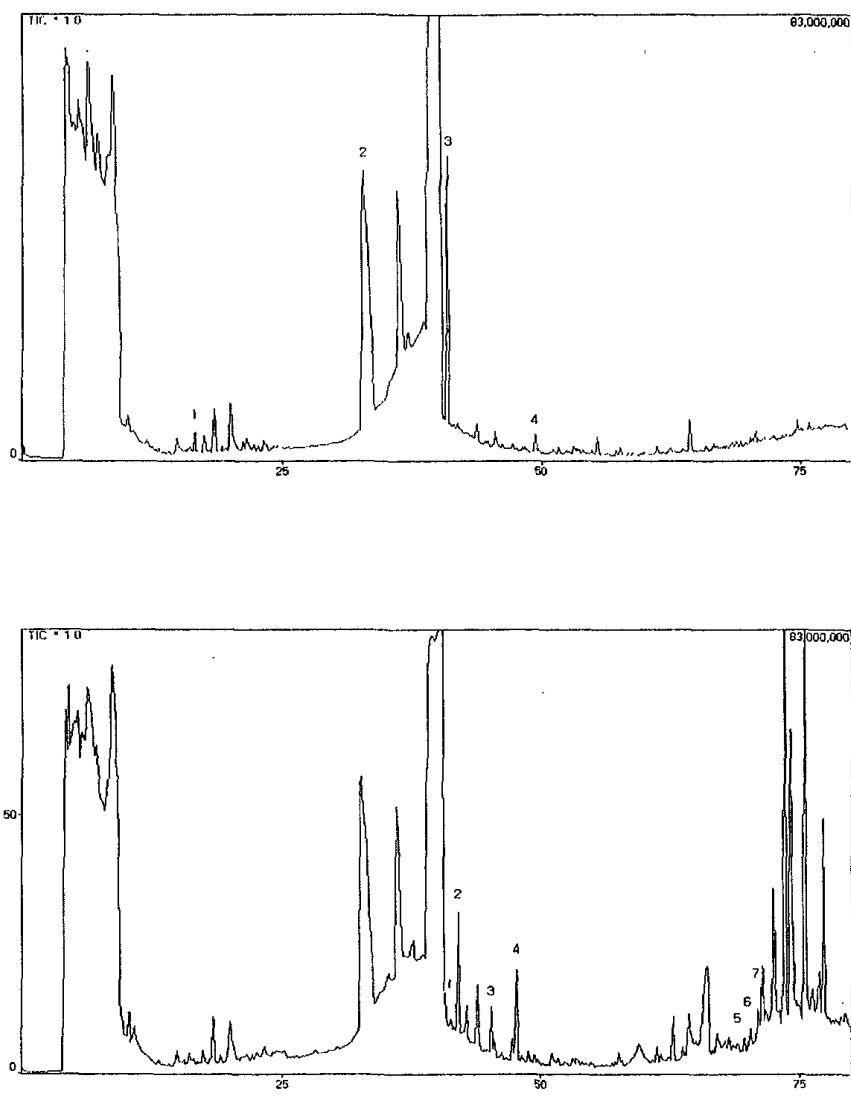


Figure 8. GC chromatograms of bioconverted products from citron oil by *Eterobacter agglomerans* 6L for 96h cultivation. Top: without microorganism & with citron oil. Bottom: with microorganism & with citron oil.

Table 7. Identification of the metabolites from the cultures with and without *E. agglomerans* 6L incubated in M9 minimal medium containing limonene as a sole carbon source for 96h.

- without 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	Limonene	16.625	1153.924	15,180,910
2	Acetic acid	32.526	1402.9198	2,292,505,161
3	Linalool	40.949	1540.6141	179,751,590
4	α -Terpineol	49.422	1672.7863	14,763,397

-with 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	trans-2-Decenal	39.958	1527.3	336,671,985
2	Octanol	40.503	1535	992,037,436
3	γ-Valerolactone	43.945	1583	88,405,656
4	Cryptone	47.701	1643.2	111,529,289
5	Cuminol	68.241	2057	10,417,784
6	Hexadecanol	69.778	2087.4	12,605,373
7	Hydroxycitronellol	71.459	2123	95,362,740

^{a)} RT: retention time

^{b)} RI: retention index

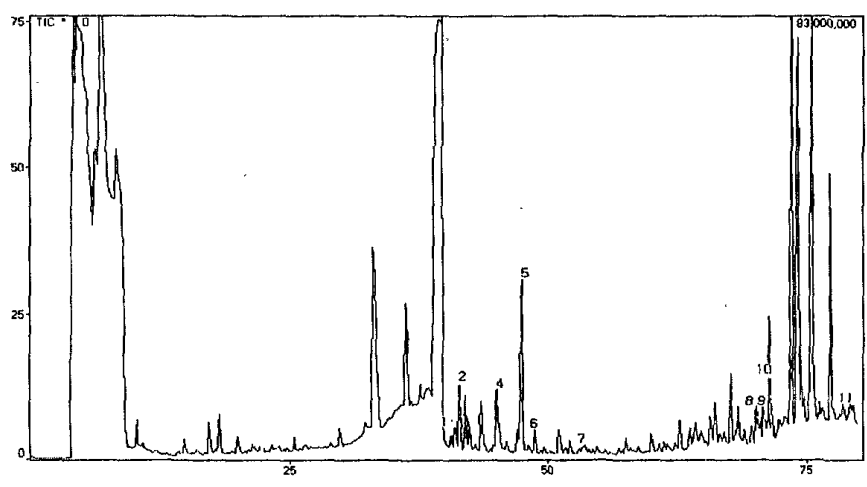
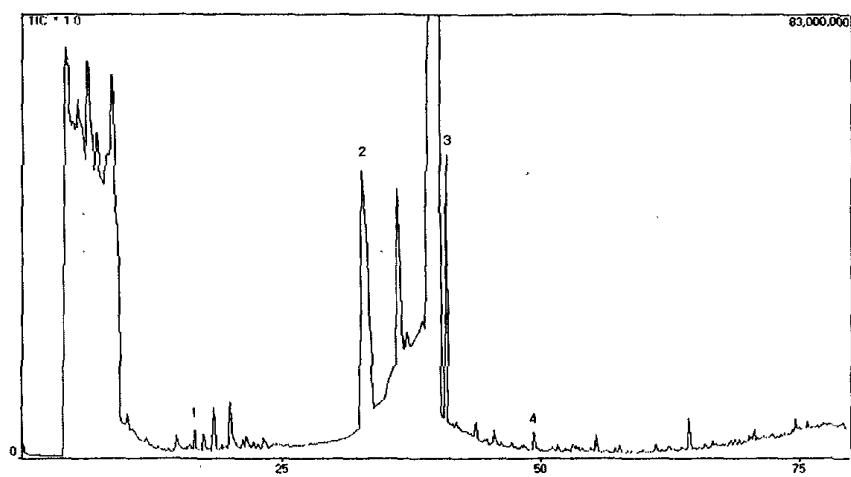


Figure 9. GC chromatograms of bioconverted products from citron oil by *Enterobacter agglomerans* 6L for 120h cultivation. Top: without microorganism & with citron oil. Bottom: with microorganism & with citron oil.

Table 8. Identification of the metabolites from the cultures with and without *E. agglomerans* 6L incubated in M9 minimal medium containing limonene as a sole carbon source for 120h.

- without 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	Limonene	15.725	1143.9534	6,236,920
2	Acetic acid	32.100	1404.6156	90,060,339
3	Linalool	38.542	1506.1195	309,496,083
4	α -Terpineol	47.192	1645.4362	14,311,403

- with 6L

Peak No	Component	RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Peak Area
1	trans-2-Decenal	39.904	1526.5	12,881,998
2	Octanol	42.019	1556.5	55,221,383
3	γ-Valerolactone	42.435	1562.4	33,250,790
4	Cryptone	47.542	1640.6	297,289,869
5	α-Camphereral	48.748	1660.4	32,235,083
6	δ-Valerolactone	54.808	1781	11,736,133
7	Cuminol	68.208	2056.3	13,317,163
8	Hexadecanol	69.768	2087.2	16,858,309
9	δ-Cadinol	71.175	2116.4	12,007,125
10	Hydroxycitronellol	71.458	2122.4	159,354,372
11	γ-Dodecalactone	79.275	>2300	51,092,475

^{a)} RT: retention time

^{b)} RI: retention index

5. 생전환된 물질의 GC-sniffing을 통한 분석

가. GC-sniffing test(향 분석)

GC-sniffing system에 시료를 injection하여 분리균주가 생산한 향기성분을 분리시키고 분리에 따른 향을 sniffing test하여 각 물질분리에 따른 향을 분석하였다. GC-sniffing test시 Gas chromatography의 operation 조건은 다음과 같다.

[Column]	DB-wax fused silica 0.25mm × 30m(J & W Sci. Co.)
[Injector]	200 °C
[Detector]	250 °C
[Column temp. program]	40 - 200 °C at 8 °C/min with a 5min initial hold time
[Injection]	1 μl

나. Limonene생전환 향기물질 분석

E. agglomerans 6L의 120시간 대사산물을 GC-sniffing test하였다 (Table 10). 이때 자동산화 등에 의한 성분변환과 미생물 대사 (bioconversion)에 의한 물질생산을 구분하기 위하여 동일한 조건에서 미생물을 넣지않고 처리한구를 대조구로 삼았다(Table 9). 대조구에서는 추출 후 전체시료에서 limonene과 유사한 냄새가 났으나 미생물에 의한 생전환 시료에서

는 달콤하면서 부드러운 송진냄새에 woody향을 복합적으로 느낄 수 있었다. 특히 RT 18.91의 fresh & sweet와 RT30이후의 woody, pine resin 냄새를 sniffing test 전 시간대에 걸쳐 가장 강하게 느꼈다. 이때 RI값으로 보아 GC-sniffing test시 18.91min에 났던 fresh & sweet가 GC-MS 분석 결과로부터 확인된 cryptone임을 알 수 있었다.

Table 9. Aroma description of the compounds from the culture containing limonene as a sole carbon source for 120h without *E. agglomerans* 6L.

RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Aroma description
10.61	1198	grass
15.63	1444	sour(식초냄새)
23.04	1919	tangerine
29.31	>2200	sweet tangerine
32.83	>2200	pine tree, strong grass
37.76	>2200	grass

a) RT: retention time

b) RI: retention index

Table 10. Aroma description of the compounds from the culture containing limonene as a sole carbon source for 120h with *E. agglomerans* 6L.

RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Aroma description
12.89	1302	fresh grass
15.73	1449	sour(식초냄새)
18.91	1639	fresh & sweet
26.31	2162	strong tangerine
28.13	>2100	fatty, peanut like
29.14	>2100	bitter
30.13	>2100	oriental medicine
30.47	>2100	woody
30.89	>2200	pine resin, woody

a) RT: retention time

b) RI: retention index

다. 유자정유 생전환 향기물질 분석

유자정유를 limonene과 동일한 방법으로 6L에 의하여 생전환 시켰을때 미생물을 접종하지 않은 대조구에서는 추출 후 전체시료에서 유자차 냄새가 낮으며 GC에 의한 시료의 분리에 따라 느낄수 있는 향기를 (Table 11)에 표시하였다. 유자정유를 6L에 의해 120시간 동안 생전환 시킨 후의 전체 추출물에서는 부드러우면서 특이한 꽃향기가 강하게 낮으며 limonene을 생전환 시킨 추출물에서보다 훨씬 강력하고 부드러웠다. GC분석에 의한 시료의 분리에 따라서는 여러가지 향을 느낄 수 있었으나(Table 12) RT 29.61과 RT31.50에서 전체시료에서 맡을수 있었던 부드럽고 특이한 꽃향기가 매우 강력하게 낮으며 이 향이 GC-sniffing test 전 시간대에서 가장 강력하고 주도적으로 느껴졌다. 그 이후 RT 35분 경에서는 조금다른 꽃향기 계열의 냄새와 woody향이 전자에 비해서는 약하게 나타났다. 이때 RT 29.61의 mild floral향이 RI값으로 보아 GC-MS 분석 결과로 확인된 Hydroxycitronellol임을 알 수 있었다.

Table 11. Aroma description of the compounds from the culture containing citron oil as a sole carbon source for 120h without *E. agglomerans* 6L.

RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Aroma description
10.80	1206	strong grass
15.64	1445	sour(식초냄새)
17.65	1561	tangerine
18.14	1591	citron like

Table 12. Aroma description of the compounds from the culture containing citron oil as a sole carbon source for 120h with *E. agglomerans* 6L.

RT ^{a)} (min)	RI ^{b)}	Aroma description
15.64	1445	sour(식초냄새)
16.70	1504	weak floral, weak woody
18.20	1594	slightly strong citral(기질)
18.60	1619	fresh grass
20.20	1722	sour, burnt citron
25.60	2113	bad odor, lightly fermented(췌냄새)
29.61	>2100	mild floral
31.50	>2100	sour, mild floral
33.50	>2200	pine, cool
34.15	>2200	citral
34.41	>2200	pine
35.37	>2200	woody, mild floral
36	>2200	woody, mild floral
37	>2200	sweet
40	>2200	citral, sour
41.48	>2200	fresh(상큼)
43	>2200	woody, fresh

^{a)} RT: retention time

^{b)} RI: retention index

제 4 절 유자정유 대사능을 지닌 유전자의 확보 (유용유전자의 자원화)

1. *E. agglomerans* 6L로부터 유자정유성분 대사능 유전자의 클로닝

가. DNA조작

모균주인 *E. agglomerans* 6L의 염색체 DNA를 steen 등의 방법으로 분리하고 shot gun method에 따라 클로닝을 시도하였다. 분리된 염색체 DNA를 제한효소 *Bam* HI으로 partial digestion하여 genomic DNA를 준비하였다. Alkaline lysis에 의해 분리된 pUC18 vector를 동 제한효소로 절단하였고 BAP(bacterial alkaline phosphatase)처리 후 T4 DNA ligase를 사용하여 준비된 염색체 DNA와 ligation하였다. Ligation DNA 혼합물의 형질전환시 *E. coli* TG1을 숙주세포로 하고 Electroporation으로 형질전환하였다.

나. 형질전환주의 선별

유자정유성분 대사능을 지닌 형질전환주의 선별은 ampicillin(50 μ g/ml)를 가한 M9 고체최소배지(noble agar, 15g; Na₂HPO₄, 6g; KH₂PO₄, 3g; NaCl, 5g; NH₄Cl, 1g per liter : pH 7.0)에 형질전환주를 도말한 후 100 μ l의 limonene을 기체상태로 공급하면서 37 $^{\circ}$ C에서 평판배양 하였다. 본 배지에서 집락을 형성하는 균주를 선별한 후 ampicillin(50 μ g/ml)을 함유한 LB(Luria-Bertanti)액체배지(bacto-tryptone, 10g; Yeast-extract, 5g; NaCl, 10g per liter)에서 하룻밤 진탕배양하였다. 배양액으로부터 alkaline lysis에 의해 plasmid DNA

를 분리하고 cloning site 제한효소(*Bam* HI)로 처리 후 삽입된 DNA의 크기를 0.8% agarose gel 상에서 확인하였다.

제한효소 *Bam* HI을 cloning site로 지나는 서로 다른 크기의 DNA 단편을 지나는 3개의 형질전환주를 획득함을 확인하였고 이를 각각 *E. coli* EC3, EC4, EC6라 명하였다.

2. 형질전환주가 지닌 유용유전자의 분석

가. 형질전환체로부터 유전자의 확인

E. coli EC3, EC4, EC6로부터 plasmid를 분리하여 삽입 DNA를 확인하였다. 형질전환주들의 plasmid DNA의 분석 결과 EC3에는 8.8kb, EC4에는 4.6 kb, EC6에는 8.2kb의 서로 다른 크기의 DNA단편이 pUC18 vector에 삽입됨을 확인하였고, 이 재조합체 DNA는 각각 pREC 3(pUC18 + 8.8kb insert DNA), pREC 4(pUC18 + 4.6kb insert DNA), pREC 6(pUC18 + 8.2kb insert DNA)라 명하였다.

나. 클로닝된 DNA의 제한효소지도 작성

pREC 3(Fig. 10), pREC 4(Fig. 11), pREC 6(Fig. 12)의 제한효소지도를 작성하였다.

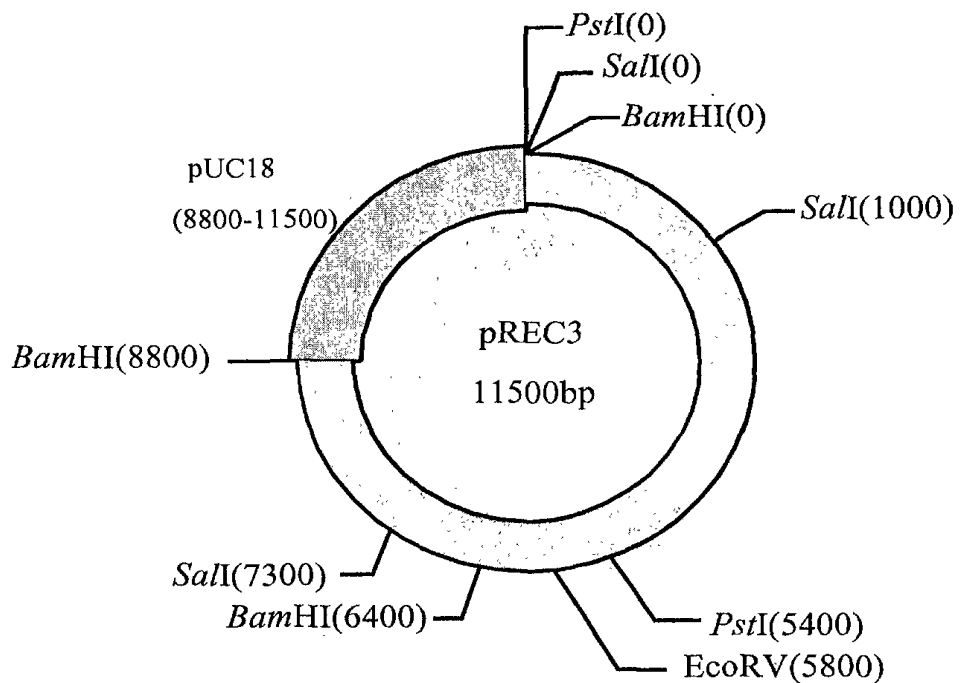


Figure 10. Partial restriction map of the pREC3.

Plasmid pREC3 is a recombinant plasmid consisting of pUC18 and the 8.8kb of *E. agglomerans* 6L. No cleavage sites were detected within the insert for restriction enzymes; *Hind* III and *Eco*R I.

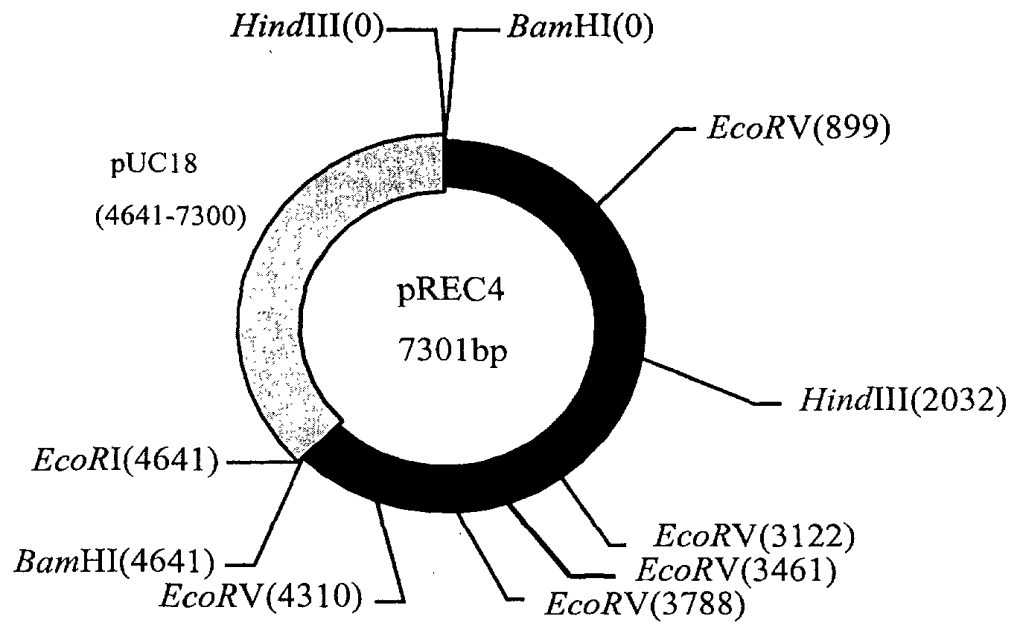


Figure 2. Partial restriction map of the pREC4.

Plasmid pREC4 is a recombinant plasmid consisting of pUC18 and the 4.6kb of *E. agglomerans* 6L. No cleavage sites were detected within the insert for restriction enzymes; *Sal* I, *EcoR* I and *Pst* I.

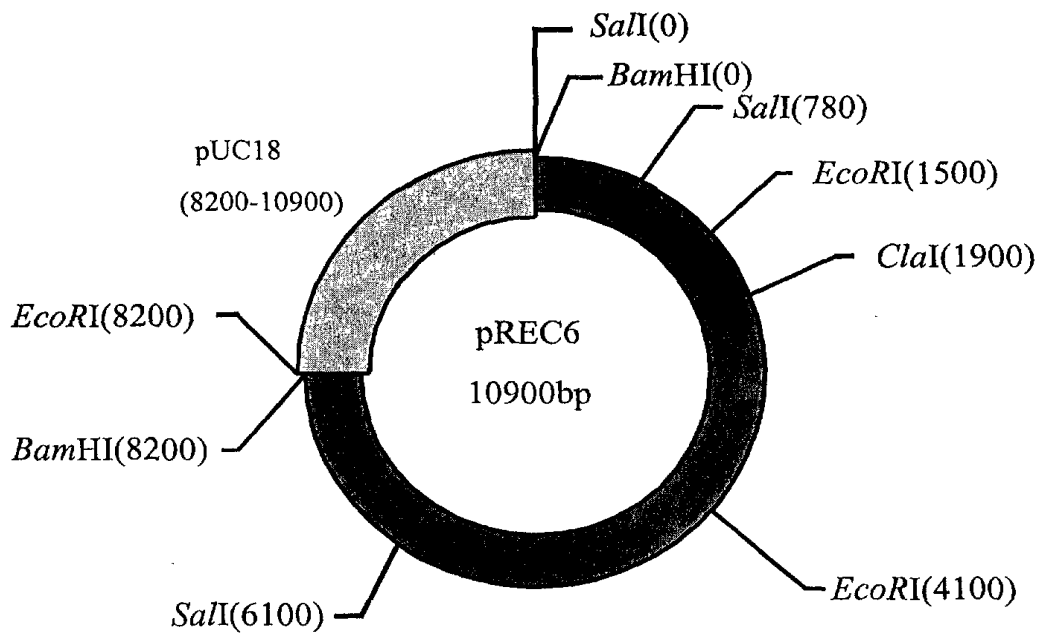


Figure 3. Partial restriction map of the pREC6.

Plasmid pREC6 is a recombinant plasmid consisting of pUC18 and the 8.2kb of *E. agglomerans* 6L. No cleavage sites was detected within the insert for restriction enzyme *Hind* III. Six sites of *EcoR* V and three sites of *Pst* I were in 8.2kb insert DNA.

다. Southern blot analysis

형질전환주인 *E. coli* EC3, EC4, EC6가 지닌 재조합 DNA가 모균주인 *E. agglomerans* 6L로부터 유래했으며, 이 서로 다른 크기의 재조합 DNA가 서로 중복된 DNA인지 별개의 서로 다른 DNA인지의 확인을 위해 southern blot 을 시행하였다.

모균주인 *E. agglomerans* 6L의 염색체 DNA를 cloning site인 *Bam* HI으로 자르고, cloning된 세 개의 각각 다른 크기의 DNA단편을 지닌 pREC 3, pREC 4, pREC 6를 동 제한효소로 잘라서 lane 1과 2에 각각 전기영동하였다. Probe DNA로는 삽입된 8.8kb, 4.6kb, 8.2kb DNA 단편만을 elution하여 사용하였다. 본 실험 결과로부터 삽입된 각기 다른 크기의 3종의 DNA 단편은 모두 모균주인 *E. agglomerans* 6L의 염색체 DNA에서 유래하였음을 확인하였다(Fig.13). 그러나 클로닝된 3종의 각기 다른 크기의 DNA 간에는 어떠한 상동성을 보이는 band도 확인되지 않아(data not shown) 3조각의 DNA 단편은 중복되지 않는 서로 다른 유전자임을 확인하였다.

이와 같이 한 모균주에서부터 limonene이나 유자정유 대사능 유전자를 3종이나 클로닝함은 매우 흥미로운 일이며 이는 모균주인 *E. agglomerans* 6L의 대사계가 매우 다양함(multi pathways)을 추측하게 한다.

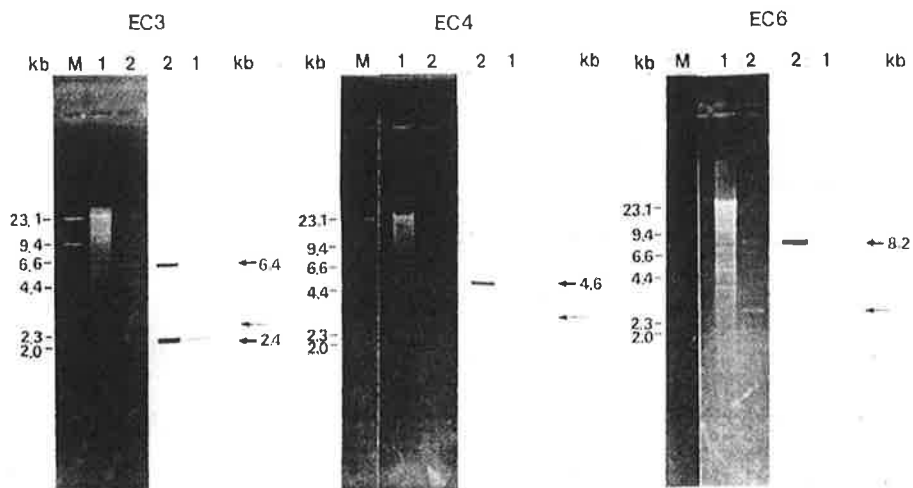


Figure 13. Southern blot hybridization of pREC 3, pREC 4 and pREC 6. Each cloned inserts(8.8, 4.6 and 8.2kb) from 6L was used as a probe. Thin arrow indicates vector position. Lane M: Molecular weight of 6L DNA, Lane 1: *Bam* HI digest of 6L DNA, Lane 2: *Bam* HI digest of recombinant plasmid ;pREC3, pREC4 and pREC6.

제 5 절 Biotransformation: 형질전환주로부터 유자정유 성분의 생전환

1. 균의 생육: 액체배지(M₉ 최소배지)에서의 성장 곡선

Limonene이나 유자정유를 탄소원으로 하는 M₉ 최소 배지내에서 배양온도는 28°C 혹은 37°C로 하여 각 형질전환주의 성장을 측정하였다.

① 37°C, limonene이 유일한 탄소원인 배지(Fig. 14), ② 37°C, 유자정유가 유일한 탄소원인 배지(Fig. 15), ③ 28°C, 유자정유가 유일한 탄소원인 배지(Fig. 16)에서 EC3, EC4, EC6의 성장을 살펴보았다.

Limonene이나 유자정유 내의 terpenoid 화합물은 대부분의 미생물에 대해 독성을 나타내므로 생육저해 현상을 일으킨다. 기보고된 유사연구의 내용에서는 위 화합물의 대사능이 있는 균주라 하더라도 추가적인 영양물공급에 의해서 적정 수준의 세포성장(A580 : 0.08)을 얻을 수 있었으나 3개의 형질전환주는 모두 어떠한 영양물의 추가적인 공급 없이도 limonene이나 유자정유만을 유일한 탄소원으로 한 배지에서 적정수준의 세포 성장(A600 : 0.08~0.14)을 나타내었다. 본 형질전환들의 숙주세포로 사용된 *E. coli* TG1을 동조건(①, ②, ③)에서 배양하였을 때는 균의 생육이 관찰되지 않았다.

배양온도에 따라 정지기에 이르는 시간이 다소 차이가 있었으나 배양 24시간 이내에 모두 정지기에 도달함을 알 수 있었다. 28°C 배양이 37°C 배양보다 더 빠른 시간에 정지기에 도달하고 cell growth도 더 높음을 알 수 있었다. 일반적인 *E. coli*의 최적 성장온도가 37°C이나 28°C보다 높은 온도인 37°C에서 휘발성(volatility)이 높은 각종의 monoterpenes 화합물의 기체운동이 더 활발해지고 기체상태로 배지 내에 공급되는 유일한 탄소원인 이 화합물들의

농도가 더 높아짐에 따른 cell에 대한 독성효과(toxicity)로 보여진다

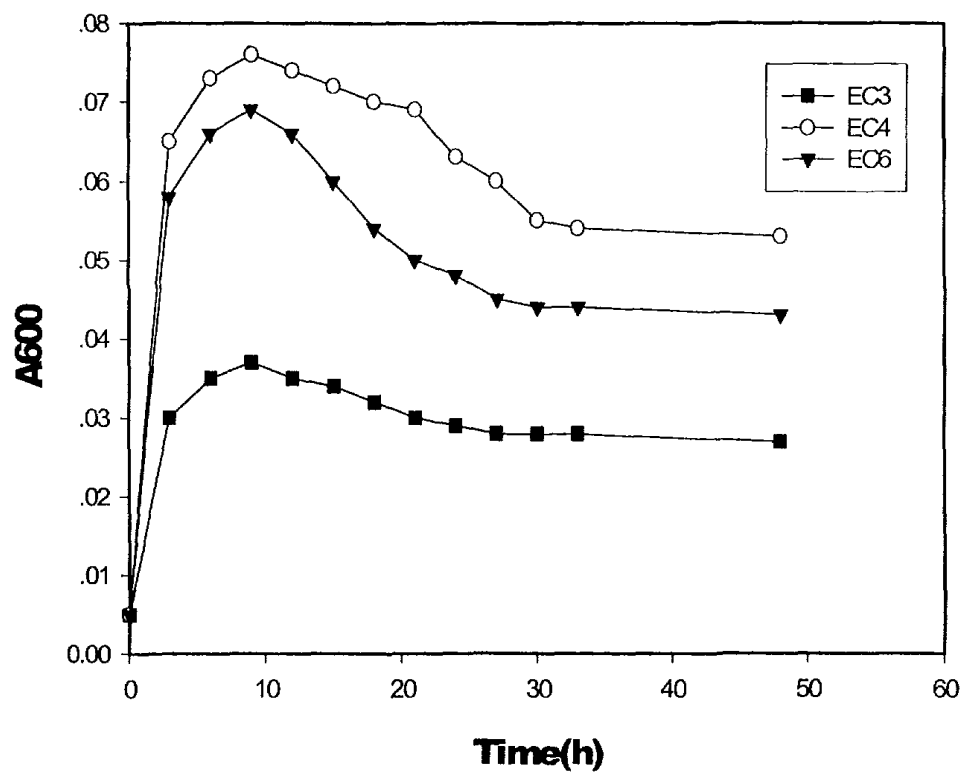


Figure 14. Growth of three transformants in M₉ minimal media with limonene as a sole carbon source at 37°C

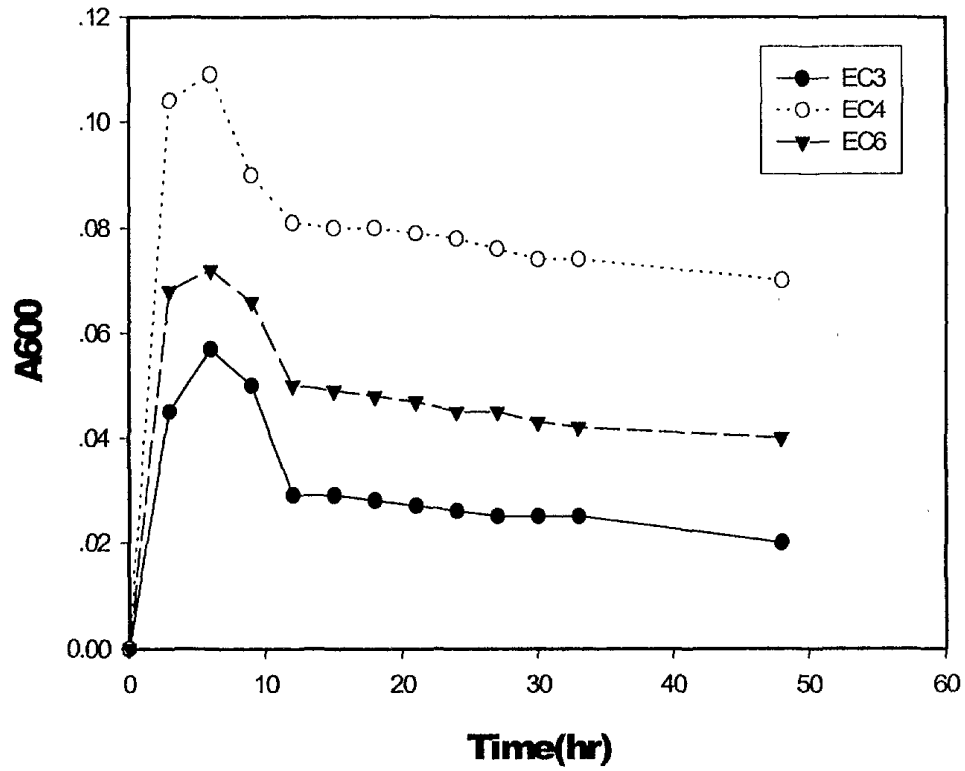


Figure 15. Growth of three transformants in M₉ minimal media with citron oil as a sole carbon source at 37°C.

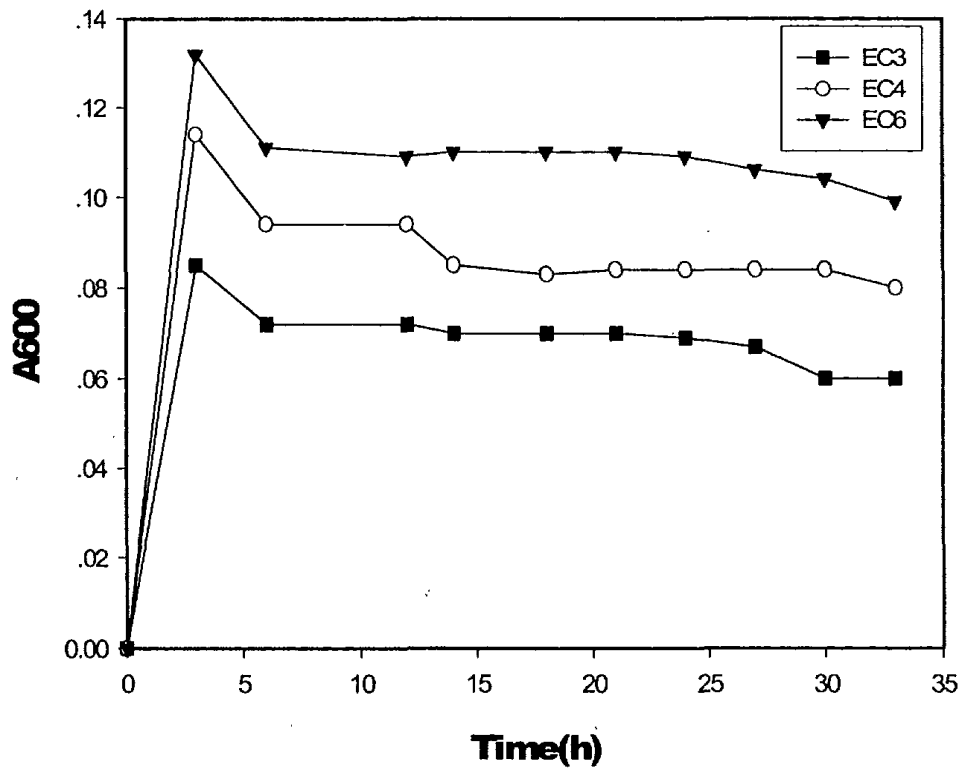


Figure 16. Growth of three transformants in M₉ minimal media with citron oil as a sole carbon source at 28°C.

2. 생전환(bioconversion): 고부가가치 향기물질의 생산

3개의 형질전환주들을 M₉ 최소 액체 배지에서 유일한 탄소원으로 유자정유를 기체상태로 지속적으로 공급하면서 37℃, 28℃에서 진탕배양하였다. 배양시간은 3, 12, 24, 36시간 혹은 6-60시간 배양혼합액을 시료로 사용하였다. 이 때 사용된 유자정유는 협동기관인 목포대학에서 폐유자박을 steam distillation하여 얻어진 것을 공급받아 사용하였다.

배양기간동안 유자정유의 자동산화에 의한 기질 내의 화합물의 변화가 있을 수 있으므로 형질전환주의 배양과 동일한 조건에서 균체만을 접종하지 않은 flask를 대조구로 삼았다. 미생물 배양액으로부터 향기성분의 추출, 향기성분의 분석(GC-MS, GC-sniffing)조건은 1차년도에 보고한 내용과 동일하게 시행하였다.

가. 37℃, 6-60시간 배양 혼합물의 분석

재조합 DNA를 지닌 숙주세포인 *E. coli*의 최적 생육 온도인 37℃에서 각 형질전환주(EC3, EC4, EC6)를 배양하였다. 축적 대사산물도 growth stage에 따라 다를 수 있으므로 6-60시간 배양 혼합물로부터 생전환된 향기성분을 분석하였다.

이 때 olfactory test를 동시에 시행하여 각 형질전환주간의 관능적인 향 비교를 동시에 시행하였다. 각 형질전환주의 생전환 추출물에서 느낄 수 있는 전체적인 향과 각 화합물에 따른 향은 각기 다양하였으며 Table 13에 요약하여 놓았다.

향기성분의 분석은 향기성분 추출 후 추출시료 전체 향을 관능적으로 검사하는 방법과 GC에 의해 분리된 물질과 이들의 mass spectrum(GC-MS)과 표준물질

의 RI에 의해 각 형질전환주에 의해 생전환된 고부가가치 향기물질의 규명하였으며 이로부터 형질전환주간의 생전환 향의 비교 분석하였다.

EC3, EC4, EC6가 유자정유로부터 생전환 시킨 가장 주요한 대사산물은 linalool이었다. Linalool은 원래 유자정유에 0.01-1.18% 정도 함유되어 있는 화합물이다. 형질전환주의 대사에 의해 linalool의 생산이 미생물을 접종하지 않은 대조구에 비해 EC3는 26배, EC4는 28배, EC6는 30배 증가하는 것으로 나타났다. 이 외에 4-terpineol, α -terpineol, thujyl alcohol이 공통적으로 검출되었으며, 형질전환주간의 상이한 생전환 화합물로는 EC3는 1-octanol, 1-decanol, EC4는 hexadecanol, EC6는 1-octanol, 1-decanol, nerolidol이 검출되었다.

Table 13. Bioconversion products by *E. coli* EC3, EC4 and EC6.
Cell was incubated at 37°C for 6-60hr with citron oil vapor as a sole carbon source.

▷ **Control**

Component	RT	RI	Peak Area
2-Pentanol(mild green, fusel oil)	21.957	1163	76,591,959
Acetic acid	40.442	1435	1,554,808,566
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.367	1542	45,011,436
4-Terpineol	50.933	1594	5,179,646
α -Terpineol	56.793	1689	3,252,641

▷ **EC3(유자향 → floral 향수와 같은 진한 꽃향기)**

Component	RT	RI	Peak Area
2-Pentanol(mild green, fusel oil)	21.529	1156	500,374,905
Limonene	22.965	1178	39,401,796
Acetic acid	40.096	1429	1,968,621,273
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.737	1547	1,184,109,191
4-Terpineol	51.156	1598	128,495,679
α-Terpineol	56.903	1691	171,423,979
1-Hexanol	27.437	1244	7,068,167
1-Octanol (orange, rose-like)	48.348	1556	20,752,426
Thujyl alcohol (lime like, minty)	52.863	1625	25,543,747
2-Decanol	52.414	1617	14,646,836
1-Decanol (sweet, oily odor, rosy)	62.976	1804	47,102,178

▷ EC4(유자향 → 시원한 꽃향기)

Component	RT	RI	Peak Area
2-Pentanol	21.600	1157	281,892,636
Limonene	22.956	1178	42,011,503
Acetic acid	40.051	1429	1,985,407,213
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.786	1548	1,255,834,985
4-Terpineol	51.179	1598	136,745,860
α-Terpineol	56.914	1691	176,204,355
Thujyl alcohol (lime like, minty)	52.887	1626	56,719,995
2-Decanol	51.955	1610	29,906,709
Octadecane	61.983	1785	56,861,758
Tetradecanol	76.954	2207	14,339,727
Hexadecanol (sweet oily odor)	82.529	2360	23,665,318

▷ EC6(유자향 → 시원하고 달콤한 비누냄새 비슷한 향)

Component	RT	RI	Peak Area
2-Pentanol(mild green, fusel oil)	21.619	1157	147,905,110
Limonene	22.789	1175	46,384,664
Acetic acid	39.933	1427	2,253,785,608
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.846	1549	1,337,778,749
4-Terpineol	51.209	1598	174,142,373
α-Terpineol	56.938	1692	254,464,280
1-Octanol (orange, rose-like)	54.343	1649	29,610,515
Thujyl alcohol (lime like, minty)	56.033	1626	79,354,123
1-Decanol (sweet, oily odor, rosy)	62.966	1805	143,103,760
Decenone	70.156	1988	102,211,108
Nerolidol (woody floral)	73.302	2071	133,034,462

나. 28℃, 생육시기에 따른 생전환 화합물의 분석

일반적인 *E. coli*의 생육최적온도는 아니나 유자정유 대사능 유전자를 지닌 *E. coli*를 배양한 본 실험에서는 28℃에서 더 높은 생육도를 나타내었으므로(Fig. 16) 28℃에서 각 형질전환주의 생육시기에 따른 그 대사산물(향기성분)을 비교 분석하였다.

28℃에서 각 형질전환주의 생육곡선을 살펴보면 배양 약 3시간에 (late log phase) 최고의 생육도를 나타내다가 이 시간 이후 정지기에 도달함을 알 수 있었다(Fig. 16). 대수기(log phase)에는 공급되는 거의 모든 기질을 세포의 에너지 대사원으로 취하기 때문에 생전환에 의한 대사산물은 이 시기 이후에 축적되었다. 그러므로 정지기동안 축적되는 대사산물의 양과 종류를 비교 분석하였다.

대조구로는 같은 온도(28℃), 같은 배양시간(3, 12, 24, 36hr)동안 동일한 배양조건(M₉ minimal w/citron oil vapor)에서 균체만 접종하지 않은 것으로 삼았다(Table 14). GC-MS 분석에 의해 대조구에서 검출되는 모든 화합물을 배양 화합물을 미생물에 의한 생전환된 화합물로 간주하였다.

GC-MS분석 전에 모든 시료는 후각 테스트를 통하여 추출물의 전체적인 향에 대한 관능검사를 시행하였다. EC3시료에서는 floral향수와 비슷한 꽃향기가 났으며 EC4시료에서는 citrus계열 향과 시원한 꽃향기가 났고 EC6 시료에서는 화한 냄새와 mild floral향이 났다. 모든 시료에서 탄소원으로 공급한 유자정유와는 전혀 다른 향이 났으며 각 시료에서 각각의 다른 향을 느낄 수 있었다.

EC3(Table 15), EC4(Table 16), EC6(Table 17) 모두 유자정유를 대사 하여 새로운 terpene화합물을 생산하는데 배양시간(3시간, 12시간, 24시간, 36시간)에 따라서 대사산물의 종류와 양이 다르게 나타났으며, 이중 배양 24시간

에 가장 많은 종류의 화합물이 검출되었으며 검출되는 화합물의 양도 일정한 함량으로 안정되게 생산되었다. 세 형질전환주 모두 대사산물 중 linalool이 가장 많은 함량으로 검출되었다. EC3, EC4, EC6 모두 유자정유로부터 생전환시킨 대사산물 중 linalool이 가장 많은 함량으로 검출되었다. Linalool의 함량은 배양 3시간부터 점차 증가하여 배양 24시간에 최고에 달하였으며 36시간에는 약간 감소하였다. 대조구에 비하여서는 EC3, EC4, EC6 ① 3hr: 26배, 35배, 47배, ② 12hr: 26배, 1.8배, 4.5배, ③ 24hr: 1배, 1.5배, 1.2배, ④ 36hr: 20배, 25배, 28배 더 많이 검출되었다. 배양 12hr, 24hr에 많은 양의 linalool이 생성되었으나 대조구에 비해 비율이 낮은 것은 동조건에서 기체가 액체배지에 녹아 들어갈 수 있는 (①공급되는 기질로부터의 linalool + ②생전환되어 생산되는 linalool) 최대량(포화)에 도달하기 때문이다.

즉 본 실험의 분석방법이 액체배지에 녹아 들어가는 방향성분만을 검출하게 되어 있어서 액체배지 내에서 균체에 의해 생전환된(bioconversion) 방향성분은 ①액체배지에 녹아 있는 방향 성분 + ②기체상태로 flask 밖으로 날아가 버리는 방향성분의 합이라는 측면에서 볼 때 ①만을 검출함으로써 발생하는 결과일 것이다. 그러므로 이러한 현상은 온도가 상대적으로 더 높은 37℃와 생육시기를 각각 분리하지 않고 모두 합한(6-60hr) 혼합물의 생전환 화합물분석에서는 관찰되지 않았다.

4-Terpineol과 α -terpineol이 주요 대사산물 이었다. Linalool의 함량은 배양 3시간부터 점차 증가하여 배양 24시간에 최고에 달하였으며 36시간에는 약간 감소하였다. 이외에 소량씩이기는 하지만 각각의 형질전환주 배양에 따라 독특한 terpene계열 화합물이 각 형질전환주의 대사산물로 검출되었다. 즉 EC3배양은 thujyl alcohol, nerolidol이 EC4는 nerol, veridiflorol, spathulenol이 EC6는 nerolidol, nerol, veridiflorol, spathulenol이 각각 검출되었다. 각각의 단독배양에 따라 검출되는 화합물 중 특정 향을 나타내는

것으로 알려진 물질에 대해서는 제시된 표에서(Table 15, 16, 17) 각각의 화합물 명 옆의 별도의 괄호 안에 그 화합물이 나타내는 향을 표시하였다.

유자정유의 70~90%는 limonene이 차지하고있다고 알려지고 있다. Limonene의 현재 단가는 72 \$/1kg이며 유자정유는 폐유자박으로부터 손쉽게 구할 수 있다. 이에 반해 전체 대사산물 중 28~30%를 차지하는 linalool의 단가는 198 \$/1kg이며 nerol은 1,820 \$/1L, nerolidol은 1,270 \$/1kg로 원료기질로 공급되는 유자정유내의 limonene에 비해 고부가가치 화합물이며 여기서 제시된 이러한 가격은 화학적 합성에 의한 화합물의 가격으로, 본 물질들이 천연물인 경우 단가가 10-100배 상승할 것이며 안전성 면에서도 화학적 화합물과는 비교 우위를 논할 필요조차 없을 것이다.

Table 14. GC-MS analysis of control flask extract with citron oil at 28°C.

▷ 3hr

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.890	1442	8,658,514
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.334	1541	8,854,130
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.791	1689	2,373,980
Tetradecanol	76.254	2179	4,082,820

▷ 12hr

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.781	1440	65,843,303
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.353	1542	505,669,111
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.771	1689	43,716,096
Limonene	23.486	1186	199,754,105
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.703	1233	29,738,274
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.961	1595	32,589,835
Hexadecanol(sweet oily odor)	82.358	2356	48,153,570

▷ 24hr

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.665	1438	394,704,014
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.533	1544	1,625,915,052
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.819	1689	267,641,837
Limonene	23.431	1185	126,780,839
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.666	1233	21,374,806
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	51.010	1596	189,215,005
Hexadecanol(sweet oily odor)	80.236	2305	23,463,791
Hexanal	16.122	1069	11,585,385
2-Pentanol(mild green, fusel oil)	20.667	1143	43,698,410
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.653	1622	17,097,323
Dodecanal	55.257	1664	4,022,998
Trans-geraniol	65.044	1853	41,712,696

▷ 36hr

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.845	1441	6,806,647
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.291	1541	56,407,659
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.740	1688	8,394,040
Limonene	23.447	1186	8,177,630
Hexadecanol(sweet oily odor)	81.667	2339	10,603,248
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.938	1594	4,124,621

Table 15. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3 at 28°C

▷ 3hr(약한 유자냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.864	1442	9,566,489
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.339	1541	233,041,175
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.781	1689	29,654,191
Tetradecanol	76.619	2195	19,467,822
Limonene	23.477	1186	4,732,487
Hexadecanol (sweet oily odor)	81.741	2341	18,601,992
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.964	1595	5,040,380

▷ 12hr(상큼한 향, citrus 향)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.709	1439	186,149,338
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.442	1543	1,288,409,151
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.772	1689	187,104,087
Limonene	23.415	1185	98,827,567
γ-Terpinene (refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.675	1233	15,960,338
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.968	1595	128,435,861
Hexadecanol(sweet oily odor)	81.664	2339	40,886,539
Thujyl alcohol (lime like, minty)	52.599	1621	17,359,081
Trans-geraniol (sweet, floral, rose, fruity)	64.939	1850	24,835,082
Tetradecanol	76.587	2194	17,912,799
2-Pentenal (pungent, green, apple, orange, tomato)	20.847	1146	14,637,123
Citral (lemon)	58.646	1722	7,969,758
Nerolidol (woody, floral)	70.722	2004	11,569,000

▷ 24hr(floral향 가장 진하게 남)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.772	1440	81,097,811
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.500	1544	1,661,591,902
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.796	1689	315,968,721
Limonene	23.481	1186	105,048,584
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.705	1233	18,819,747
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.988	1595	204,257,907
Hexadecanol(sweet oily odor)	81.686	2340	59,084,789
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.618	1621	28,411,497
Dodecanal	55.214	1664	9,408,174
Trans-geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	64.981	1851	27,869,179
β -Terpineol(pungent-woody-earthy)	52.746	1623	9,248,874
Citral(lemon)	58.653	1723	12,453,670
Nerolidol(woody, floral)	70.742	2004	20,723,802
Tetradecanol	74.942	2123	20,349,644

▷ 36hr(사워코롱류의 mild 한 floral 향)

Component	RT	RI	Peak Area
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.400	1542	1,128,264,916
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.758	1689	157,508,885
Limonene	23.433	1185	35,681,391
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.941	1594	109,942,399
Hexadecanol(sweet oily odor)	79.400	2282	6,637,789
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.667	1233	6,548,502
1,8-Cineol(camphoraceous)	24.281	1198	4,198,727
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.593	1621	14,862,742
Dodecanal	55.203	1663	4,451,553
1-Decanol(floral, fruity, waxy, fatty)	58.641	1722	8,787,026
4-Dodecanol	68.747	1948	36,774,587
1-Dodecanol(mild, oily fatty, slightly waxy)	69.097	1958	46,127,255
Nerolidol(woody, floral)	73.485	2076	55,410,054
Tetradecanol	76.100	2173	18,071,466

Table 16. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC4 at 28°C.

▷ 3hr(썩은 나무냄새 + 유자향)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.712	1439	146,828,935
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.365	1542	311,498,853
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.771	1689	37,594,680
Tetradecanol	75.444	2144	104,451,713
Limonene	23.523	1187	141,758,741
γ-Terpinene (refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.753	1234	16,546,037
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.968	1595	24,731,193
Hexadecanol (sweet oily odor)	80.545	2313	38,964,802
1-Decanol (floral, fruity, waxy, fatty)	62.192	1789	12,733,656
Octadecane	64.787	1847	10,143,976
1-Dodecanol (mild, oily fatty, slightly waxy)	68.570	1943	9,624,867
Octadecanol (grassy, penetrating green - vegetable, powerful)	89.559	2521	78,756,137

▷ 12hr(꽃향기)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.597	1437	338,001,176
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.332	1541	883,936,032
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.698	1688	86,086,611
Limonene	23.433	1185	104,334,578
γ-Terpinene (refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.657	1233	9,994,620
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.899	1594	67,218,945
Hexadecanol(sweet oily odor)	82.273	2353	9,063,191
Hexadecane	51.206	1598	4,736,767
Nerol (sweet rosy, refreshing wet seashore odor)	64.555	1841	4,143,351

▷ 24hr(약품냄새→유자향+꽃향기)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.612	1438	326,333,308
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.525	1544	2,379,891,625
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.718	1688	303,965,817
Limonene	23.473	1186	695,630,883
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.670	1233	88,533,731
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.943	1594	279,589,375
Hexadecanol(sweet oily odor)	82.270	2353	14,057,922
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.544	1620	18,471,454
Trans-geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	64.602	1843	27,153,211
Tetradecanol	75.748	2157	12,227,139
1,8-Cineol	24.292	1198	25,803,808
3-Hexene-1-ol (green grass)	36.639	1377	16,082,682
2-Hexene-1-ol (powerful, leafy green, wine-like fruity)	38.111	1398	8,027,943
Linalool oxide (powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	42.428	1467	16,915,145
1-Octanol (sharp, fatty, waxy, citrus)	48.255	1555	17,956,222
Linalyl acetate (pleasant, sweet, floral, fruity)	48.539	1559	24,746,941
β-Terpineol (pungent-woody-earthly)	52.649	1622	15,861,302
Z-Citral	56.052	1677	3,830,441
1-Nonanol (powerful, oily-floral, fresh, petal-like odor)	57.421	1699	4,502,476
Citral (lemon)	58.587	1721	16,656,114
Nerol (sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	62.422	1793	8,290,429
Veridiflorol	73.201	2068	49,721,832
Spathulenol	74.596	2107	42,987,556

▷ 36hr(citrus 강함, 약한 꽃향기)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.642	1438	91,379,171
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.358	1542	1,418,056,281
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.665	1687	178,422,977
Limonene	23.437	1185	442,578,257
Hexadecanol(sweet oily odor)	82.186	2353	8,494,528
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.858	1593	130,476,968
γ -Terpinene	26.637	1232	48,475,297
Linalool oxide (powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	40.485	1435	12,420,412
Linalyl acetate (pleasant, sweet, floral, fruity)	48.438	1558	7,236,240
Thujyl alcohol (lime like, minty)	52.472	1619	13,396,616
β-Terpineol (pungent-woody-earthly)	52.627	1621	6,888,224
Z-Citral	55.553	1669	4,654,638
Citral (lemon)	58.546	1721	10,097,654
Carvone (warm-herbaceous, breadlike, spicy and slightly floral odor)	58.826	1726	11,028,201
Nerol (sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	62.351	1792	4,190,470
Trans-carveol	63.938	1827	14,826,934
Cis-carveol (caraway-like)	65.283	1858	14,426,897
Veridiflorol	73.150	2067	13,410,616
Spathulenol	74.562	2106	47,844,407

Table 17. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC6 at 28°C.

▷ 3hr(화한냄새, 약한 유자향)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.739	1440	84,766,919
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.319	1541	426,784,545
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.735	1688	45,641,856
Tetradecanol	74.350	2098	4,474,185
Limonene	23.484	1186	205,566,305
r-Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.694	1233	20,980,221
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.922	1594	33,104,731
Hexadecanol (sweet oily odor)	80.937	2305	13,507,823
Nerol (sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	64.598	1842	3,987,718

▷ 12hr(약품냄새→화한냄새→약한 꽃향기)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.464	1435	817,344,587
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.533	1544	2,264,470,013
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.747	1689	488,966,467
Limonene	23.451	1185	281,273,464
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.678	1233	16,601,958
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.966	1595	337,703,745
Hexadecanol(sweet oily odor)	82.528	2360	19,782,967
Thujyl alcohol (lime like, minty)	51.808	1608	3,543,369
2-Hexanol	29.067	1267	19,174,972
β-Terpineol (pungent-woody-earthly)	52.661	1622	24,414,838
E-Citral (lemon)	56.052	1677	16,151,638
Z-Citral	58.587	1721	15,451,938
Nerol (sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	62.389	1793	25,326,435
Nerolidol (woody, floral)	70.681	2003	17,130,663
Veridiflorol	73.207	2068	36,318,592
Spathulenol	74.611	2108	143,464,869

▷ 24hr(citrus 계열, 화한 냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.628	1438	221,911,568
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.458	1543	1,968,065,486
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.722	1688	400,220,078
Limonene	23.443	1185	205,401,907
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.671	1232	25,842,139
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.920	1594	261,909,302
Thujyl alcohol (lime like, minty)	52.568	1620	22,009,195
Trans-geraniol (sweet, floral, rose, fruity)	63.503	1840	73,371,953
1-Hexanol (slightly fatty and fruity odor)	34.552	1347	25,932,963
Linalool oxide (powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	40.525	1436	13,845,299
1-Octanol (sharp, fatty, waxy, citrus)	48.189	1554	12,925,312
β-Terpineol (pungent-woody-earthly)	52.646	1622	16,929,134
Z-Citral (lemon)	58.584	1721	11,372,796
Carvone (warm-herbaceous, breadlike, spicy and slightly floral odor)	58.857	1726	13,536,192
Nerol (sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	62.388	1793	16,858,560
Trans-carveol (caraway-like)	63.969	1828	9,320,629
Veridiflorol	73.182	2068	26,452,524
Tetradecanol	75.718	2156	7,151,055

▷ 36hr(mild 꽃향기, 스킨냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.679	1439	48,001,776
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.392	1542	1,564,010,097
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	56.683	1687	318,381,851
Limonene	23.425	1185	115,819,231
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.873	1593	193,946,036
γ -Terpinene	26.638	1232	8,466,687
Linalool oxide (powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	42.380	1466	11,989,372
Thujyl alcohol (lime like, minty)	52.473	1619	20,266,472
β-Terpineol (pungent-woody-earthly)	52.613	1621	11,680,549
Z-Citral	55.564	1669	8,968,218
E-Citral	56.011	1677	20,021,925
Citral (lemon)	58.555	1721	19,529,528
Carvone (warm-herbaceous, breadlike, spicy and slightly floral odor)	58.842	1726	14,117,202
Nerol (sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	62.369	1792	6,929,737
Trans-carveol	63.948	1827	27,817,614
Cis-carveol (caraway-like)	65.292	1859	24,889,690
Elemol	70.610	2001	7,964,501
Veridiflorol	73.151	2067	15,083,097
Spathulenol	74.569	2107	85,776,398

제 6 절 유용 향기성분의 최적생산공정 정립

1. 단독배양과 공동배양

유자정유 성분 대사능을 지닌 모균주 *Bam* HI *Enterobacter agglomerans* 6L의 염색체 DNA를 분리하고 shot gun method에 따라 클로닝하여 획득한 서로 다른 크기의 DNA 단편을 지닌 *E. coli* 형질전환주 EC3, EC4, EC6를 공동배양하였다. 공동배양액의 접종균주들은 EC3+EC4, EC3+EC6, EC4+EC6, EC3+EC4+EC6로 하였다.

단독배양은 공동배양과 동일한 조건에서 EC3, EC4, EC6를 각각 단독으로 접종하여 시행하였다. 이때 유자정유성분의 자동산화와 미생물대사에 의한 유자정유의 생전환을 구분하기 위하여 대조구로는 미생물 생전환 플라스크와 동일한 조건에서 배양 미생물을 접종을 하지 않은 것으로 삼았다.

E. coli 형질전환주 EC3, EC4, EC6과 공동배양액을 M9 최소배지에서 유일한 탄소원으로 유자정유를 기체 상태로 지속적으로 공급하며 28°C에서 진탕 배양하였다. A₆₀₀에서의 혼탁도로 측정하여 공동배양액의 성장곡선을 측정하였다 (Fig. 17). 단독배양에서 *E. coli* 형질전환주 EC3, EC4, EC6는 배양 후 3시간 만에 최고의 성장률을 보였으며, A₆₀₀에서 각각 0.085, 0.114, 0.132을 나타내었다. 공동배양에서 각각의 형질전환주는 동 시간대에 A₆₀₀에서 0.3에서 0.4에 이르는 모두 매우 높은 성장률을 나타내었다. 따라서 *E. coli* 형질전환주를 단독배양했을 때 보다 공동배양 했을 때 약 3~4배 더 높은 세포 배양을 할 수 있었다.

유자정유의 주요화합물인 limonene 및 그 밖의 terpene 화합물의 대사능을 지닌 미생물의 대사경로는 이미 밝혀진 것들이 있다. 이들 미생물의 대부분은

이 경로들 중 한 가지 대사경로를 주 경로로 이용하는 것으로 알려지고 있다. 그러나 *Enterobacter agglomerans* 6L은 이중 한 가지 대사경로만 가지 않고 여러 가지 경로를 동시 다발 적으로 운영하는 것으로 보인다. 이러한 *Enterobacter agglomerans* 6L로부터 각각의 다른 유자정유 대사능 유전자 단편을 클로닝하여 지니고 있는 *E. coli* 형질전환주인 EC3, EC4, EC6는 모균 주 에서와 같이 다양한 유자정유 대사능 경로를 지니고 있지 않고 그중 일부에 속하는 정유 대사능(한가지 대사경로)을 지니고 있다. 각각의 다른 대사경로에 해당하는 유자정유 대사능 유전자를 동시에 발현시키는 시스템(두 가지 또는 세 가지 대사경로)인 공동배양에서는 부분적인 유자정유 대사능이 상보적으로 전체대사에 관계하므로 단독배양에서 보다 높은 대사체계 구축이 가능하고, 그러므로 동 시스템에서 단독배양에서 보다 높은 균 생육도를 나타내는 것으로 사료된다.

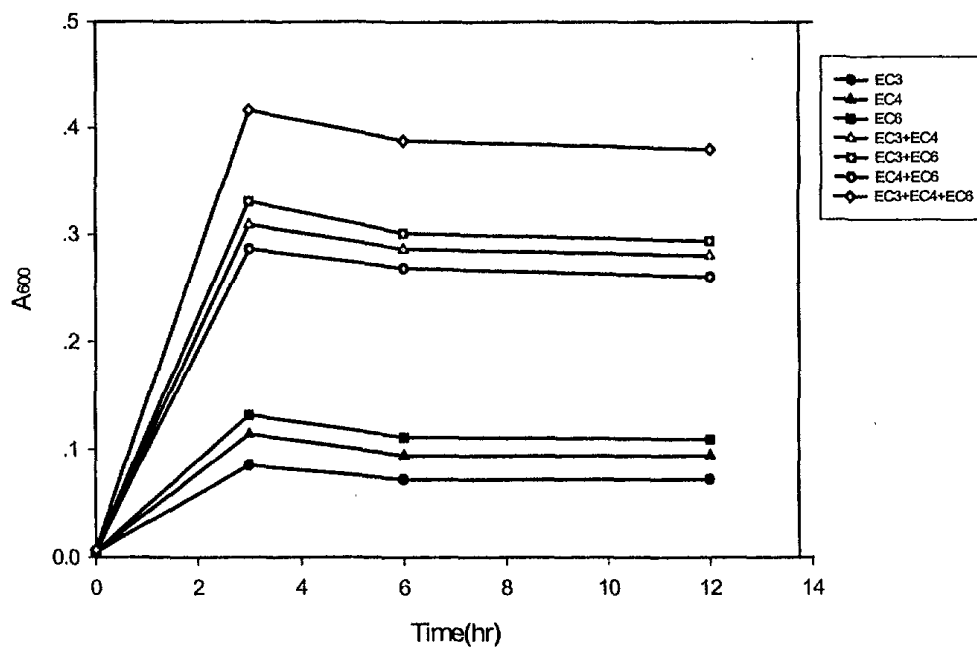


Figure 17. Growth of three transformants and four co-cultures in M₉ minimal media with citron oil as a sole carbon source at 28°C.

2. 공동배양에 의한 유자정유의 생전환

단독배양에서와 같이 공동배양에서도 GC-MS분석 전에 모든 시료를 후각을 통한 관능검사를 시행하였다. EC3+EC4에서는 연한 citrus 계열향이 났고, EC3+EC6에서는 달콤한 꿀냄새, EC4+EC6에서는 꽃향과 은은한 citrus 계열향이 섞여서 났으며 EC3+EC4+EC6에서는 꽃향과 달콤한 향이 섞인 화장품 냄새를 느낄 수 있었다. 이는 유자정유 냄새와는 전혀 다른 향이었으며 단독배양 시료의 향과도 다른 향을 느낄 수 있었다. 미생물 공동배양에 의한 유자정유 생전환 플라스크와 동일한 조건에서 배양미생물을 접종하지 않은 대조구로부터의 배양시간에 따른 GC-MS분석결과(Table 18)와 공동배양액의 대사산물을 GC-MS분석 결과를 Table 19, 20, 21, 22에 나타내었다.

공동배양액에서도 단독배양에서와 같이 유자정유를 생전환 시킨 대사산물 중 linalool이 가장 많은 함량으로 검출되었고 4-terpineol과 α -terpineol이 주요대사산물이었다. *E. coli* 형질전환주 공동배양에서 검출되는 그 밖의 화합물들은 단독배양과는 각기 다른 terpene계열 화합물들이 각각의 공동배양액 대사산물로 검출되었다. 즉 ① EC3+EC4의 공동배양에서는 Elemol, Nerol, Nerolidol ② EC3+EC6의 공동배양에서는 Nerolidol, Cyclohexanone ③ EC4+EC6의 공동배양에서는 Z-Citral 그리고 ④ EC3+EC4+EC6의 공동배양에서는 Nerol, β -Cyclocitral이 각각 검출되었는데, 이들 화합물들이 각각의 공동배양에 따른 독특한 향을 나타내는 원인물질로 추정된다. 또한 각각의 공동배양에 따라 검출되는 화합물 중 특정 향을 나타내는 것으로 알려진 물질에 대해서는 제시된 표에서(Table 19, 20, 21, 22) 각각의 화합물 명 옆의 별도의 괄호 안에 그 화합물이 나타내는 향을 표시하였다.

공동배양의 배양시간에 따른 대사산물의 생산은 주 대사산물인 linalool의 경우 배양 후 12시간과 24시간에 걸쳐 점차 증가하여 72시간배양액에서는 최

대 생산량을 나타냈다. 이 밖의 대사산물의 생산도 단독배양에서는 배양 12~24시간만에 최대생산이 이루어 졌으나 공동배양에서는 배양 72시간에 최대생산을 얻을 수 있었다. 즉 배양 후 72시간에 단독 배양시의 linalool 최대생산량 보다 EC3+EC4 공동배양은 약2배, EC3+EC6 공동배양은 약1.7배, EC4+EC6 공동배양은 약1.5배, EC3+EC4+EC6 공동배양은 약2배 더 높았고, 4-terpineol은 단독 배양시 보다 공동배양 EC3+EC4은 약3배, EC3+EC6은 약1.4배, EC4+EC6은 약1.8배, EC3+EC4+EC6은 약1.6배 더 높았으며 α -terpineol은 단독배양시 보다 공동배양 EC3+EC4은 약2.5배, EC3+EC6은 약1.2배, EC4+EC6은 약1.3배, EC3+EC4+EC6은 약1.5배 더 높았다.

배양 24시간에 많은 양의 linalool, 4-terpineol, α -terpineol이 생성되었으나 대조구에 비해 비율이 낮은 것은 동조건에서 기체가 액체배지에 녹아 들어갈 수 있는(①공급되는 기질로부터의 linalool(or 4-terpineol, α -terpineol)+②생전환되어 생산되는 linalool(or 4-terpineol, α -terpineol) 최대량(포화)에 도달하기 때문이다.

유자정유대사능 형질전환주들의 공동배양에서 얻어진 생전환 화합물 중 nerol의 단가가 1,820 \$/1kg Nerolidol은 1,270 \$/1kg Citral은 827 \$/1kg β -Cyclocitral은 15,120 \$/1kg 으로 유자정유의 최대 구성물질인 limonene의 단가에 비해 약3~200여배 높음을 알 수 있고, 본 화합물의 제시가가 화학적 합성일 때의 가격임을 고려할 때 본 연구에 의해 생전환 된 물질들은 천연물이므로 가격 면이나 안전성 면에서 월등한 비교 우위에 설 수 있다.

또한 각각의 유자정유 대사능을 지닌 형질전환주 EC3, EC4, EC6의 조합에 따른 공동배양으로 특정 향을 지닌 각각의 향기물질 생산이 가능함을 알 수 있었다. 즉 각기 다른 유자정유대사 체계를 지닌 미생물의 조합에 의하여 여러 가지 향기 생산이 가능함으로 저렴하고 신속한 방법으로 다양한 생물학적 향기생산이 가능하다는 것이다.

이들 미생물 대사에 의해 생산된 이들 고부가가치 향기 대사산물의 활용분야는 식품첨가제, 식품 보존제, 향신료등의 식·음료용뿐만 아니라 향암제, 진정, 구풍, 소화, 해열, 진정, 강장, 항우울제, 피부질환 치료제 등의 기능이 있는 의약품, 그외 각종 향장품, 비누, 목욕 용품, 피부 관리제, 가글제, 방향제를 비롯하여 난분해성 terpene화합물 분해시키는 환경 정화제, 부엌 및 자동차 등의 세정 및 방향제 등에 응용되는 항균세정제 등으로 활용될 수 있을 것이다.

Table 18. GC-MS analysis of control flask extract with citron oil at 28°C

▷ 12hr

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.781	1440	65,843,303
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.353	1542	505,669,111
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.771	1689	43,716,096
Limonene	23.486	1186	199,754,105
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.703	1233	29,738,274
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.961	1595	32,589,835
Hexadecanol(sweet oily odor)	82.358	2356	48,153,570

▷ 24hr

Component	RT	RI	Peak Area
Acetic acid	40.665	1438	394,704,014
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.533	1544	1,625,915,052
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	56.819	1689	267,641,837
Limonene	23.431	1185	126,780,839
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.666	1233	21,374,806
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	51.010	1596	189,215,005
Hexadecanol(sweet oily odor)	80.236	2305	23,463,791
Hexanal	16.122	1069	11,585,385
2-Pentanol(mild green, fusel oil)	20.667	1143	43,698,410
Thujyl alcohol(lime like, minty)	52.653	1622	17,097,323
Dodecanal	55.257	1664	4,022,998
Trans-geraniol	65.044	1853	41,712,696

▷ 48hr

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	19.710	1147	18,045,328
Limonene	22.006	1182	167,337,728
α -Phellandrene	22.645	1192	10,496,020
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.338	1232	31,834,384
trans-Ocimene	25.856	1239	4,748,067
Acetic acid	39.862	1447	3,419,777
Linalooloxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.558	1473	9,774,206
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.643	1551	1,636,092,332
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.042	1602	177,272,353
β -Terpineol	51.781	1631	12,833,058
Thujyl alcohol	54.227	1672	6,739,477
z-Citral	55.132	1687	3,804,243
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.844	1699	240,462,933
Carvone	57.976	1737	5,720,515
trans-Geraniol	61.667	1804	15,946,699
Nerol	63.836	1853	46,391,924

▷ 72hr

Component	RT	RI	Peak Area
Limonene	22.809	1195	162,125,569
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.972	1241	24,800,839
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.465	1548	458,250,816
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	49.991	1602	29,078,723
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.794	1698	34,052,777
Nerol	63.882	1854	4,155,914

Table 19. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3+EC4 at 28°C.

▷ 12hr(약간 향긋, 탕자냄새칼럼, 시원함)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.154	1154	18.835.102
Limonene	22.805	1195	328.081.003
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.942	1241	61.824.219
Ocimene (warm-herbaceous, sweetness)	26.353	1247	4.790.192
α -Terpinolene(powerful,minty -camphoraceous)	28.475	1278	4.317.831
Acetic acid	39.905	1448	6.644.090
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.611	1474	2.656.888
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.636	1551	822.368.085
4-Terpineol (warm-peppery,mildly earthy, musty-woody odor)	50.074	1603	71.315.272
β -Terpineol(pungent-woody-earthy)	51.836	1632	3.594.630
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.888	1700	96.383.069
Nerol(sweet rosy, refreshing wet seashore odor)	63.887	1854	4.294.488
Elemol (very faint)	71.849	2064	9.893.804

▷ 24hr(상큼, 화한 스킨냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.179	1154	16.563.461
Limonene	22.825	1195	266.695.961
α -Phellandrene(pleasant, fresh-citrusy, peppery-woody)	23.403	1204	8.366.755
α -Terpinene	25.958	1241	54.336.504
Acetic acid	39.908	1448	20.425.730
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.623	1474	4.668.531
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.745	1552	1.262.071.099
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.130	1604	113.037.889
β -Terpineol(pungent-woody-earthy)	51.863	1633	10.619.441
Cryptone	54.300	1673	2.460.138
α -Citral(lemon)	54.775	1681	2.572.591
Citral(lemon)	55.229	1689	2.599.799
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.932	1701	147.565.206
β -Citronellol(sweet, fresher, lighter rosy-floral)	57.782	1734	5.220.198
Valelic acid(powerful, penetrating, diffusive acid odor)	58.011	1738	5.793.226
trans-Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	61.663	1804	6.307.417
Nerol(sweet rosy, refreshing wet seashore odor)	63.826	1853	16.985.892
Veridiflorol	72.591	2085	14.191.390
Nerolidol(woody, floral)	72.872	2092	26.570.904
Tetradecanol	83.441	2330	15.439.523

▷ 48hr(연한탕자)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.557	1160	26,502,087
Limonene	22.848	1196	572,100,574
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.972	1241	112,702,774
Ocimene(warm-herbaceous,sweetness)	26.393	1248	4,710,424
α -Terpinolene(powerful,minty -camphoraceous)	28.499	1278	5,838,164
Acetic acid	39.658	1444	31,158,080
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetratingodor, floral-woody-earthly)	41.548	1473	14,099,301
β -Cyclocitral	44.555	1519	11,528,293
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.785	1553	2,641,582,273
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.072	1603	271,698,306
Thujyl alcohol	54.235	1672	7,865,463
z-Citral	54.720	1680	3,515,249
β -Terpineol	54.967	1684	1,751,139
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.873	1700	351,853,151
Carvone	57.992	1737	6,894,671
Nerol	63.837	1853	4,430,434
Elemol	71.865	2065	16,618,323
Nerolidol	72.840	2091	35,369,770

▷ 72hr(화한냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
<i>β</i> -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.556	1160	56,370,072
Limonene	22.850	1196	463,542,571
<i>α</i> -Phellandrene(pleasant, fresh-citrusy, peppery-woody)	25.974	1242	108,592,613
<i>trans</i> -Ocimene	26.363	1247	19,632,478
Ocimene(warm-herbaceous,sweetness)	28.497	1278	11,273,137
Cyclohexanone(powerful,minty, camphoraceous)	28.993	1286	10,589,831
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.558	1473	33,942,163
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	47.033	1557	4,526,295,119
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.213	1605	618,057,144
Thujyl alcohol	54.558	1678	1,712,699
z-Citral	55.140	1687	30,480,843
<i>α</i> -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.984	1702	765,660,557
Nerol	63.802	1852	27,554,740
Elemol	73.506	2106	87,828,498

Table 20. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3+EC6 at 28°C

▷ 12hr(탱자냄새 많이남)

Component	RT	RI	Peak Area
Myrcene	20.537	1160	14.885.011
Limonene	22.827	1195	270.362.875
β -Phellandrene	23.378	1204	8.105.796
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.960	1241	50.669.390
β -Cymene	27.592	1265	13.623.602
Acetic acid	39.921	1448	9.041.323
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.680	1551	871.360.684
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.105	1603	75.203.285
β -Terpineol(pungent-woody-earthly)	51.862	1633	3.333.001
α -Citral	54.770	1681	2.439.676
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.920	1700	96.978.598
Carvone	57.780	1734	3.228.839
cis-Geraniol	63.940	1855	6.465.279
Dodecanol	68.708	1978	10.468.794
Nerolidol(woody, floral)	71.860	2065	6.266.785

▷ 24hr(연한탕자 꽃향)

Component	RT	RI	Peak Area
Limonene	22.800	1195	135.905.296
γ -Terpinene(pleasant, citrusy)	25.967	1241	25.040.102
Acetic acid	39.924	1448	11.186.163
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.634	1475	2.935.337
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.694	1552	819.118.220
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.113	1604	66.956.087
Thujyl alcohol(lime like, minty)	51.868	1633	2.580.092
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.919	1700	86.322.427
cis-Geraniol	63.854	1854	6.862.422
Nerolidol(woody, floral)	72.877	2092	17.586.466
Hexadecanol(sweet oily odor)	83.454	2330	14.346.575

▷ 48hr (탱자 냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.579	2085	30,044,271
Limonene	22.900	1196	729,166,151
α -Phellandrene	23.424	1204	57,883,884
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	26.000	1242	144,047,049
Ocimene(warm-herbaceous,sweetness)	26.410	1248	3,892,484
α -Terpinolene	28.513	1279	7,402,240
Cyclohexanone (powerful,minty, camphoraceous)	29.022	1286	3,563,674
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.572	1474	14,350,478
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.810	1553	2,667,731,683
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.099	1603	286,543,745
Thujyl alcohol	54.254	1673	8,387,535
z-Citral	54.735	1681	1,909,495
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.899	1700	378,413,850
Isoboneol (camphoraceous)	56.423	1709	2,134,427
Citral(lemon)	57.484	1728	2,211,378
cis-Carveol	64.637	1871	5,411,873
Elemol (very faint)	72.599	2085	33,581,378
Nerolidol	72.860	2092	45,947,885

▷ 72hr (달콤, 시원함)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.562	1160	17,085,915
Limonene	22.842	1196	319,180,213
α -Phellandrene	23.415	1204	15,086,120
trans-Ocimene	23.607	1207	24,325,360
Ocimene(warm-herbaceous,sweetness)	25.189	1230	5,256,933
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.991	1242	65,295,472
α -Terpinolene	28.522	1279	4,562,478
Cyclohexanone (powerful,minty, camphoraceous)	29.020	1286	4,063,331
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.569	1474	17,256,259
Linalyl acetate (pleasant, sweet floral, fruity)	44.578	1520	11,132,280
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.867	1554	2,930,707,354
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.144	1604	320,495,280
β -Terpineol	51.808	1632	47,091,382
Thujyl alcohol	54.262	1673	15,984,286
α -Citral	54.767	1681	1,151,454
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.924	1700	395,964,585
Nerolidol	72.864	2092	42,427,404

Table 21. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC4+EC6 at 28°C.

▷ 12hr (머리아픈 냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
Limonene	22.786	1195	113.747.046
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.968	1241	19.713.874
Acetic acid	39.942	1448	8.997.594
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.667	1551	745.047.208
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.111	1604	61.929.464
Citral(lemon)	54.784	1681	2.536.463
z -Citral(lemon)	55.243	1689	2.055.312
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.927	1700	83.163.692
trans-Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	63.949	1856	5.880.543

▷ 24hr(탱자냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.539	1160	23.790.659
Limonene	22.850	1196	302.789.540
β -Phellandrene	23.396	1204	8.761.452
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.970	1241	56.066.216
Acetic acid	39.913	1448	13.280.776
Linalool oxide (powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.630	1474	4.651.697
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.746	1552	1.207.378.678
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.126	1604	104.180.573
β -Terpineol(pungent-woody-earthly)	51.857	1633	6.175.301
Cryptone	54.321	1674	4.196.186
Citral(lemon)	54.770	1681	3.391.357
α -Citral(lemon)	55.225	1689	2.046.297
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.927	1700	132.850.435
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	61.672	1804	6.995.853
trans-Geraniol(sweet, floral, rose, fruity)	63.865	1854	9.537.672

▷ 48hr(은은한 citrus)

Component	RT	RI	Peak Area
<i>β</i> -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.527	1159	24,393,471
Limonene	22.779	1195	116,630,801
<i>γ</i> -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.951	1241	17,051,683
Ocimene (warm-herbaceous,sweetness)	26.346	1247	7,781,439
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.521	1473	13,980,458
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.718	1552	2,129,894,310
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.067	1603	258,300,503
Thujyl alcohol	54.224	1672	7,287,974
<i>z</i> -Citral	55.110	1687	9,522,849
<i>α</i>-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.881	1700	399,453,027
trans-Geraniol	63.786	1852	15,928,080
Nerolidol(woody floral)	72.263	2076	18,442,642

▷ 72hr(화한냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.613	1161	20,167,832
Limonene	22.876	1196	197,261,003
γ -Terpinene	26.055	1243	37,739,809
Ocimene (warm-herbaceous, sweetness)	28.582	1280	3,883,644
Cyclohexanone (powerful,minty, camphoraceous)	29.022	1286	3,984,850
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.632	1474	21,197,580
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.869	1554	3,412,218,850
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.152	1604	547,587,278
β -Terpineol	51.820	1632	43,950,242
z-Citral	54.189	1671	43,605,966
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.927	1700	472,231,292
trans-Geraniol	61.699	1805	22,432,950
cis-Caveol	64.399	1866	35,344,488

Table 22. Citron oil bioconversion products of *E. coli* EC3+EC4+EC6 at 28°C.

▷ 12hr(꽃향, 달콤)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.492	1159	12.739.739
Limonene	22.726	1194	237.581.144
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.878	1240	49.616.098
trans-Ocimene	26.299	1246	5.022.984
α -Terpinolene	28.414	1277	3.965.685
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.542	1473	3.676.597
Linalool(refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.609	1550	965.451.185
4-Terpineol(warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.022	1602	83.305.988
β -Terpineol(pungent-woody-earthy)	51.774	1631	5.503.502
α -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.834	1699	119.987.215
Nerol(sweet rosy, refreshing wet seashore odor)	63.965	1856	4.532.451

▷ 24hr(화장품냄새 비슷)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.7	1162	14.589.543
Limonene	22.770	1194	283.101.094
γ -Terpineol	25.907	1241	55.763.319
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.565	1473	4.441.497
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.674	1551	1.210.392.889
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.066	1603	112.712.798
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.874	1700	157.559.963
Citral	57.943	1736	4.396.183
Nerol(sweet rosy, refreshing, wet seashore odor)	63.927	1855	4.594.965
Hexadecanol(sweet oily odor)	81.575	2281	16.596.806

▷ 48hr(달콤한 냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
β -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.536	1160	19,996,427
Limonene	22.805	1195	247,284,331
α -Phellandrene	23.554	1206	15,974,856
γ -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.954	1241	43,429,568
Ocimene(warm-herbaceous,sweetness)	28.493	1278	3,412,041
Cyclohexanone (powerful,minty, camphoraceous)	29.003	1286	4,322,274
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthy)	41.559	1473	16,191,903
β-Cyclocitral	44.554	1519	5,083,853
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.793	1553	2,460,516,976
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.096	1603	260,023,746
β -Terpineol	51.791	1632	29,301,993
α -Citral	55.131	1687	10,977,515
α-Terpineol (fragrant, floral, lilac)	55.905	1700	367,276,880

▷ 72hr(상큼→탄 냄새: 텁텁한 냄새)

Component	RT	RI	Peak Area
<i>β</i> -Myrcene(sweet-balsamic-resinous)	20.509	1159	22,145,811
Limonene	22.733	1194	117,106,817
<i>α</i> -Phellandrene	23.333	1203	16,352,558
<i>γ</i> -Terpinene(refreshingly herbaceous -citrusy odor)	25.905	1241	21,313,177
Ocimene (warm-herbaceous,sweetness)	26.364	1247	5,327,486
Acetic acid	39.664	1444	112,185,556
Linalool oxide(powerful sweet-woody, penetrating odor, floral-woody-earthly)	41.517	1473	26,448,424
trans-2-Octenol (powerful,penetrating)	43.106	1497	24,349,353
<i>β</i> -Cyclocitral	44.522	1519	14,568,205
2-Nonanol (powerful, penetrating)	45.501	1534	2,872,919
Linalool (refreshing, light, clean, floral, citrus, sweet, lemon, orange, fragrant)	46.783	1553	3,300,290,339
4-Terpineol (warm-peppery, mildly earthy, musty-woody odor)	50.070	1603	396,590,065
<i>β</i> -Terpineol	51.756	1631	54,620,759
Citral	55.095	1687	15,222,515
<i>α</i> -Terpineol(fragrant, floral, lilac)	55.863	1700	514,372,071
Valeric acid (powerful, penetrating diffusive acid odor)	57.797	1734	25,877,961
trans-Geraniol	61.650	1803	6,156,864
Nerol	63.795	1852	17,358,059
cis-Carveol	64.567	1870	5,672,303
Elemol (very faint)	71.834	2064	17,800,701
Veridiflorol	72.544	2083	34,454,267

- 본 연구에서 결과 및 그 의의를 총 정리 요약하면 다음과 같다.

균 주	특성 및 성과 내용
<p style="text-align: center;">유 용 미 생 물 ^ 모 균 주 v</p>	<p style="text-align: center;"><i>Enterobacter agglomerans</i> 6L</p> <ul style="list-style-type: none"> • limonene과 유자정유성분(limonene 외의 다수의 monoterpenes의 혼합물)을 대사할 수 있는 미생물 • 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : γ, δ-valerolactone, trans-2-decenal, octanol, cryptone, cuminol, δ-cadinol, γ-dodecalactone α-camphereral, hydroxycitronellol, • 기존의 보고된 limonene이나 다른 monoterpenes을 대사할 수 있는 미생물보다 훨씬 높은 대사능 : limonene toxicity에 대한 저항성 → 기존 보고보다 30배 이상 ↑ 산업적 활용 가능성 ↑ <p>▶ 개선점 : ① 야생 분리균주인 6L의 대사계 불안정 ② 아주 다양한 대사산물 (highly multicomound products) : 종류는 많으나 주 대사산물의 함량이 낮음 → 실제 산업에 적용 시 정제비용의 부담(경제성 ↓)</p>

균 주	특성 및 성과 내용
유용유전자 △ 형질전환주 √	<ul style="list-style-type: none"> 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : linalool, 4-terpineol, α-terpineol, thujyl alcohol, nerolidol, 기타 alcohol과 aldehyde류 향의 특징(olfactory test) : floral 향수와 비슷한 꽃향기
	<ul style="list-style-type: none"> 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : linalool, 4-terpineol, α-terpineol, nerol, veridiflorol, spathulenol, 기타 alcohol과 aldehyde류 향의 특징(olfactory test) : citrus 계열 향, 시원한 꽃향기
	<ul style="list-style-type: none"> 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : linalool, 4-terpineol, α-terpineol, nerolidol, nerol, veridiflorol, spathulenol, 기타 alcohol과 aldehyde류 향의 특징(olfactory test) : 화한 냄새, mild floral
	<ol style="list-style-type: none"> 안정된 대사계 형질전환주의 배양 온도 : 37°C 보다 28°C가 유리 (cell growth ↑, product 손실 ↓) Bioconversion product : 현재 단가는 linalool (전체 대사산물 중 28-30% 차지) : 198\$/kg ; nerol : 1820\$/ℓ ; nerolidol : 1270\$/kg → 본 물질이 천연물(natural)인 경우 단가 10-100배 상승 (고부가가치, 안전성) 모균주가 배양 120hr(5일)만에 product를 얻을 수 있음에 반해 재조합 균주는 24hr(1일)만에 product 회수 가능(경제성 ↑) 각 형질전환주간의 대사산물의 단순화(모균주에 비해) → 유자정유의 degrading pathway 규명의 근거 제시

균 주	특성 및 성과 내용
EC3+EC4	<ul style="list-style-type: none"> 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : linalool, 4-terpineol, α-terpineol, nerol, elemol, nerolidol 향의 특징(olfactory test) : 연한 citrus 계열 향
EC3+EC6	<ul style="list-style-type: none"> 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : linalool, 4-terpineol, α-terpineol, nerolidol, cyclohexanone 향의 특징(olfactory test) : 달콤한 꿀 냄새
EC4+EC6	<ul style="list-style-type: none"> 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : linalool, 4-terpineol, α-terpineol, z-citral 향의 특징(olfactory test) : 꽃향과 은은한 citrus 계열 향
EC3+EC4+EC6	<ul style="list-style-type: none"> 유자정유로부터 고부가가치 향기물질 생산 : linalool, 4-terpineol, α-terpineol, nerol, β-cyclocitral 향의 특징(olfactory test) : 꽃향과 달콤한 향
최적 생산 공정 ^ 공동 배양 v	<p>① 균생육 : 유자정유대사능 형질전환주들의 - 단독배양: A_{600}: 0.085~0.132; 공동배양: A_{600}: 0.3~0.4 - 단독배양보다 공동배양시 약 3-4배 높은 세포 생육</p> <p>② 생전환에 의한 대사 산물의 생산 - 단독배양: 배양 12~24시간만에 최적생산 - 공동배양: 배양 72시간</p> <p>③ 단독, 공동배양에서 공통적으로 검출되는 주요 대사산물 (linalool, 4-terpineol, α-terpineol) - 단독배양보다 공동배양에서 1.2~2.5배 ↑</p> <p>④ Bioconverters product - 유자정유중의 70~90% 차지하는 limonene의 현재 단가: 72\$/kg - 생전환 산물들: 약 200\$/kg~2000\$/kg (citral, nerol, β-cyclocitral 등) → 생전환의 초기기작인 유자정유에 비해 3~200배에서 높은 부가가치 → 이들 향기물질들이 본 연구에서와 같은 천연물질인 경우 단가 10~100배 상승</p> <p>▶ 유자정유 대사능을 지닌 형질전환주의 단독배양시보다 이들의 공동배양에 의하여 더 높은 균생육을 얻을 수 있었고 이로부터 대사산물의 생산량 증대</p> <p>▶ 형질전환주들의 조합에 따른 배양으로 각각 다른 향을 나타내는 생전환물 생산 가능(미생물적 조향 가능 시사)</p>

제 3 장 폐유자박으로부터 정유 및 기능성 물질 의 분리와 응용

제 1 절 서설

유자(Citron, *Citrus junos*) 중국 양자강 상류의 사천(四川), 호북(湖北), 운남(雲南), 감숙성(甘肅省)에서 티베트까지 자생이 되는 식물로 후생감귤아속이 속하는 작물로 현재 우리 나라에서는 제주도를 포함하여 고흥, 완도, 장흥 등 남해안 일대에서 자생하고 있다. 년 평균기온 15℃ 전후의 해양성기후에서 잘 생육하는 유자는 80년대 초반까지는 큰 규모가 아니었으며, 80년대 중반이 되면서 급격히 증가하고 다시 90년대 중반에 와서 규모면에서 비약적인 발전을 하여 96년 현재 5,121ha에 18,520M/T을 생산하여 일본보다 많은 세계 최대생산국이 되었다. 그러나 유자의 생산량은 비약적으로 증가한데 비하여 그 가공방법이 낙후되어 소비증가량이 생산증가량에 미치지 못하여, 급기야 96년을 기점으로 유자 가격의 하락을 가져오게 되었고, 유자재배 면적도 더 이상 증가하지 않고 감소하는 추세에 있다. 이처럼 유자의 가공방법이 발전하지 못한 원인은 여러 가지가 있겠으나, 일차적으로 유자자체를 식용할 수 없다는 점이 가장 큰 문제라고 할 수 있겠다. 유자의 향은 매우 고상하고 기호도가 높은 천연향이나 과실자체가 식품으로서의 가치가 없기 때문에 소비가 증가할 수 없는 실정이고, 또 다른 원인은 우리나라의 식문화에 기인한다고 생각되는데, 우리나라 사람은 대부분의 음식에 특별한 경우를 제외하고는 강한 향이 혼입되는 경우를 싫어하기 때문에 일본에서와 같이 향함유 식품에 대한 거부감이 있어 이를 식품화하는데 어려움이 있기 때문으로 생각된다. 이

러한 상황에서 유자 가공방법으로 사용하고 있는 가장 보편적인 것은 유자를 당절임하는 유자청의 제조인데 이것 역시 소비량에 한계가 있고, 장기저장에 어려움(갈변화)이 있어 유자소비에 큰 기여를 할 수 없는 실정이다. 유자는 예부터 유자청의 형태로도 소비되어져 왔으나, 많은 부분이 민간요법제제로 사용되어져 왔는데, 예를 들면 목에 가시가 걸렸을 때나 신경통에는 씨를 뺀 아서 달여먹고, 티눈과 사마귀에는 씨를 태운 다음 밥에 버무리려 환부에 붙였으며, 유산했을 때나 산후 복통에는 유자 껍질을 달여 먹었고, 유자를 두 쪽으로 갈라서 속을 완전히 긁어내고 그 속에 들기름으로 버무린 된장을 양쪽에 채워놓고 다시 짝을 맞추어 껍질이 약간 탈때까지 굽어, 이 들기름 된장을 유자 된장이라고 하고, 밥맛이 없다든지 소화가 잘 되지 않을 때 먹으면 좋다고 사용하였다(유태종, 식품보감).

이처럼 과잉생산된 유자의 소비 방안을 반드시 식품가공학적인 측면에서 접근하는 것보다도 유자가 보유하고 있는 기능성 성분에 초점을 맞추고, 이를 분리 정제하여 기능성 식품 소재 개발분야에 초점을 맞추고, 신제품을 개발하여 유자의 소비확대를 이루고자 하는 것이 본 연구과제의 목표이다.

본 과제는 이러한 과점에서 2 가지 기능성 성분에 초점을 맞추었는데, 하나는 유자에 풍부히 함유된 천연 유자향을 정유형태로 분리하여, 향장품을 제조하는 process를 정립하는 것이고, 다른 하나는 유자가 다른 감귤류에 비하여 섬유질의 함량이 높은 것에 착안하여 유자박으로부터, 수용성 식이 섬유인 펙틴과 식이섬유를 분리하여 제품화하는 공정을 개발하는 것이다. 유자정유는 최근 연구가 활발히 진행되고 있는 아로마테라피의 기능을 충분히 수행할 수 있을 것으로 기대되며, 또한 기존의 향제품에 대부분 사용되어 오던 합성향에 대한 위해적인 요소가 크다하여 점차 소비를 줄이는 상황이므로 향후 활용방안은 확대될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 감귤류에 함유된 펙틴 등의 식이 섬유물질은 다른 식물에서 추출한 경우보다 품질 및 물성이 우수한 것으로 알

려져 있기 때문에 유자로부터 분리한 펙틴 및 식이섬유는 충분히 생리활성 기능을 보유할 것으로 기대되며, 특히 혈중 콜레스테롤 저하효과를 지니고있는 식이섬유제품을 목적으로하여 제품을 개발하는 연구를 추진하고자 한다.

제 2 절 폐유자박으로부터 정유 성분의 추출

1. 유자박의 전처리

본 연구에 사용한 유자박은 1998년도와 1999년도 전라남도 고흥 및 완도에
서 생산된 유자를 농가로부터 직접 구입하거나, 일부는 고흥군에 소재한 두원
농협으로부터 폐유자박을 제공받아 사용하였다. 농가로부터 직접 구입한 경우
는 구입 직후 유자를 압착기(실험실에서 자체 제작)를 이용하여 압착하여 유
자착즙액을 분리한 다음, 유자박은 모두 유자씨와 따로 분리하여 -20℃에
5kg정도의 무게로 나누어 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

유자박으로부터 유자 정유, 펙틴 그리고 식이섬유를 분리하기 위해서는 경
우에 따라서는 건조된 상태로, 때로는 생유자박을 그대로 사용하였다. 건조
유자박의 경우는 열풍 건조와 냉동건조 과정을 각각 실시하여 분쇄한 다음,
50 mesh 체로 사별하여 사용하였다.

건조 유자박의 수분 함량은 표 1과 같다.

2. 용매에 의한 추출

정유성분의 용매추출은 dichloromethane과 methanol을 사용하여 실시하였
다. 동결건조하여 분쇄한 후, 50mesh체로 사별한 유자분말 50g을 500ml의 용
매와 섞은 후, dichloromethane의 경우는 20℃로 미리 조정된 항온수조에서 4
시간동안, methanol의 경우는 60℃로 유지된 항온수조에서 2시간 동안 200rpm
의 속도로 진탕시키며 추출하였다. 추출후 Whatman no.1의 여과지를 사용하여
고형분을 제거한 후, 무수황산소다를 첨가하여 잔존하는 수분을 제거한 다음,

동 여과지로 여과하였다. 여과된 정유추출물은 rotary vacuum evaporator를 사용하여 용매를 제거하였다. 증발농축기의 감압은 vacuum pump를 사용하였으며, 농축은 40℃에서 증발하고 남은 추출액의 무게변화가 없을 때까지 실시하였다. Dichloromethane의 경우는 건조 중량에 대하여 6.8% 그리고 methanol의 경우는 30.6%로 methanol의 경우는 월등히 높은 수율로 oleoresin을 제조할 수 있었다(표 2). 그러나 이들 용매로 정유를 추출할 때, 최종 올레오레진의 색이 너무 진하고, 정유이외의 물질로 동시에 추출되기 때문에 유자 특유향을 나타내기가 어렵고, 또한 투명을 요하는 제품의 경우에는 매우 제한적일 수밖에 없다고 판단된다.

3. 초임계 추출에 의한 추출

냉동건조 유자분말을 초임계 CO₂ 추출방법의 시료로 사용하였다. 각 처리구의 시료량은 50g의 유자분말을 사용하였고, 추출조건은 40℃에서 추출압력 1500psi, 3000psi 그리고 4000psi에서 15분간 정유성분을 추출하였다. 표 3에서 보는 바와 같이 3000psi에서 추출한 경우가 수율면에서 가장 좋은 것으로 나타났으며, 관능적으로는 용매로 추출한 올레오레진보다는 많은 유자향을 나타내고 있으며, 색도 비록 추출된 카로틴 때문에 노란색을 띠기는 하지만 거의 투명한 노란색을 보여 주었다.

4. 증류에 의한 추출

정유성분의 증류에 사용한 시료는 생유자박과 동결건조된 유자박을 각각 사용하였다. 증류는 직화시에는 가열부와 접한부위의 유자박이 너무 과열되어 유자의 가열취가 심하게 발생하기 때문에 수증기 증류하였다. 사용한 증기

는 steam generator를 사용하여 증기압력을 조절하며 조건을 정립하였다. 증기압력은 2kgf/cm(118℃)로 고정하고 5분, 10분, 30분, 60분, 120분, 180분으로 나누어 증류를 실시하였다. 증류에 의한 추출효율은 다른 방법에 비하여 낮으나 (1% 내외, 표 4), 투명한 정유를 얻을 수 있다는 점에서 다른 방법에 비하여 우수하다고 판단되었고, 본 연구에 참여한 연구진의 관능적인 평가에서도 세 가지 방법중에서 증류로 추출된 정유의 경우가 가장 우수한 것으로 판명되어 향후 연구에 증류에 의한 정유를 사용하기로 결정하였으며, 이를 위하여 정유 추출 조건의 최적화를 확립하였다.

Table 1. Water content of citron peel waste.

method	water content(%)	average (%)
freeze drying	79.2	79.6
hot-air drying	80.0	

Table 2. Yield of citron oil extracted by solvents.

solvent	yield(%)	remark
dichloromethane	6.8	thick, viscous, brown
methanol	30.6	diluted, yellowish

Table 3. Yield of citron oil extracted by CO₂ supercritical extraction

pressure(psi)	1500	3000	4500
yield(%)	0.46	9.06	1.64

Table 4. Yield of citron essential oil produced by steam distillation

time(min)	5	10	30	60	120	180
yield(%)	0.65	0.76	0.95	1.05	1.09	1.15

5. 정유 추출조건의 최적화

가. 증류시간에 따른 수율

증류시간은 유자박을 함유한 혼합물이 증기에 의하여 가열되어 수증기가 발생한 후 처음으로 응축수가 수기에 포집되는 시간을 초기시간으로 결정하여, 5분, 30분, 60분까지 증류하였다. 60분에서 증류를 중단한 이유는 그 이상에서는 추출수율이 더 이상 증가하지 않기 때문이고 이는 전 실험에서 이미 결정하였다.

나. 온도에 따른 수율 및 성분 분석

증류온도는 사용하는 수증기의 압력에 의하여 결정되기 때문에 발생하는 증기 압력을 조절하여 사용하고, 사용한 증기의 압력은 $2\text{kg}_f/\text{cm}^2(115^\circ\text{C})$, $2.5\text{kg}_f/\text{cm}^2(128^\circ\text{C})$, $3.0\text{kg}_f/\text{cm}^2(132^\circ\text{C})$, $3.5\text{kg}_f/\text{cm}^2(142^\circ\text{C})$ 였다. (표 5, 6)

수율면에서 $2.5\text{kg}_f/\text{cm}^2(128^\circ\text{C})$ 의 온도에서 30-60분까지 증류하는 것이 약 1.33-1.43%로 가장 바람직하였고 성분 분석 결과도 이 온도에서 증류하는 것이 가장 좋은 조건으로 나타났다.

증류로 향을 추출하는데 1992년 H. Tamuar 등은 유자향이 열에 불안정하여 증류는 유자향을 추출하는데 부적합한 방법이라고 보고하였으나 본 연구 결과, 증류에 의하여도 매우 우수한 조성의 정유를 얻을 수 있음을 확인하였다. 증류시의 시간 및 온도별 조건을 분석한 결과 $2.5\text{kg}_f/\text{cm}^2(128^\circ\text{C})$ 에서 30분에서 1시간 증류하는 것이 가장 좋은 조건으로 결정되었으나 사용하는 steam 양이 제조원가에 미치는 영향이 크므로 30분으로 결정하였다. (표 6)

Table 5. Yield of citron essential oil at various temperature and time.

온도	시간(분)	수율
2.0kgf/cm ² (115℃)	5	0.65
	30	0.95
	60	1.01
2.5kgf/cm ² (128℃)	5	0.74
	30	1.33
	60	1.43
3.0kgf/cm ² (132℃)	5	0.69
	30	0.96
	60	1.16
3.5kgf/cm ² (142℃)	5	0.68
	30	0.95
	60	1.10

Table 6. Amount of steam used for essential oil production.

가열시간(분)	수율	증기량(g)
5	0.65	142
10	0.70	178
15	0.85	281
30	0.95	540
60	1.05	956
120	1.09	1991
180	1.15	2100

제 3 절 추출방법에 따른 유자 정유 성분의 특성

1. 추출공정에 따른 정유 성분의 분석

가. 정유 성분의 분석

유자박으로부터 여러 가지 추출방법으로 분리된 추출물의 향을 GC 분석 및 Olfactory test(sniffing test)를 통하여 유자향에 가장 영향을 주는 화합물의 Retention Index(RI)를 결정한 후, 동일 시료의 GC-MS 분석 결과와 표준물질의 authentic RI와 비교하여 화합물을 결정하였다. GC-Olfactory test에 사용한 GC-column은 실험의 오차를 제거하기 위하여 극성 column인 DB-wax 와 비극성 column인 DB-5MS를 모두 사용하여 향기 성분을 분리, 동정하였다.

나. 용매로 추출한 올레오레진의 정유 성분

용매로 추출한 올레오레진의 GC-MS 분석 결과를 표 7에 나타내었다. 올레오레진에는 약 16종의 주된 향기 성분이 확인되었으며, 그 중에서도 l-limonene, linalool, γ -terpinene, β -farnesene, germacrene b, germacrene d, thymol, β -caryophyllene 등이 주 화합물로 확인되었다. 일반적인 감귤류의 정유성분에 함유된 각 향기성분에 일반적인 함량에 비추어 limonene의 함량이 다소 낮은 것이 확인되었는데, 이는 추출물의 정유 순도가 낮기 때문에 생기는 결과라고 판단된다.

다. CO₂ 초임계추출 정유의 성분

CO₂ 초임계로 추출한 정유의 GC-MS 결과를 표 8에 나타내었다. 액체 상태

의 CO₂는 비극성의 성질이 강하기 때문에 이로 추출한 정유 역시 일반적인 증류나 용매로 추출한 경우와는 매우 다른 양상을 보이는데, 가장 특이한 것은 limonene으로 함량이 전체의 1.94%(150 psi의 경우)에서 4500psi에서 추출한 경우는 전혀 GC-MS 상에서 peak를 검출할 수가 없었다. 그리고 가장 강하게 꽃 향을 나타내는 linalool의 함량도 1.53% 이하로 매우 상이한 조성의 정유를 얻을 수 있었다.

라. 증류추출된 정유의 성분 분석

증류추출된 정유의 성분을 표 9에 나타내었다. 증류추출된 정유의 주 성분은 용매추출한 경우와 유사하였으나, 함량순으로보면 1-limonene, linalool, γ -terpinene, β -myrcene, α -pinene, β -farnesene, cis, cis- α -farnesene 순이고 thymol의 함량이 상대적으로 낮은 값을 보여주고 있다. Thymol은 증류온도가 높고, 추출시간이 길 때 그 함량이 증가하는 화합물로서 탄 성분에 나는 향 특성을 보여주고 있다. 결과적으로 주요 향 성분의 함량이 비슷하다면, bad flavor를 내는 성분이 적은 쪽이 우수하다고 볼 수 있으므로 비록 양은 추출수율은 낮지만 증류에 의한 추출방식이 향후의 사용에 더 유리할 것으로 기대된다.

Table 7. GC-MS analysis of oleoresin extracted by solvents from Ciron peel.

No	compound	treatment	
		MeOH	Dichloro methane
1	α -pinene	0.55	0.37
2	β -pinene	0.85	1.16
3	myrcene	0.94	2.89
4	l-limonene	44.04	50.73
5	γ -terpinene	8.11	1.69
6	linalool	8.76	4.49
7	α -terpineol	0.87	0.37
8	thymol	1.10	0.97
9	α -terpinene	0.81	-
10	β -cryophyllene	1.04	0.13
11	β -farnesene	4.15	1.42
12	germacrene d	1.23	0.13
13	germacrene b	4.02	0.30
15	δ -caadiene	0.60	-
16	cis,cis- α -farnesene	-	1.31

Table 8. GC-MS analysis of essential oil extracted by CO₂ super critical extraction methods from Ciron peel.

No	compound	treatment		
		1500 psi	3000 psi	4500 psi
1	l-limonene	1.94	1.33	-
2	linalool	1.54	1.03	1.31
3	α -terpineol	-	1.24	-
4	thymol	5.33	4.19	4.31
5	α -terpinene	2.17	2.12	2.30
6	hydroxylinalool	-	1.79	-
7	β -elemene	1.59	1.69	1.72
8	β -caryophyllene	1.52	1.98	2.13
9	β -farnesene	13.43	13.80	14.58
10	germacrene d	3.13	3.39	3.40
11	bicyclogermacrene	13.24	13.38	14.56
12	α -amorphene	-	0.95	-
13	δ -cardiene	3.83	3.18	3.12
14	germacrene b	2.72	1.98	1.75
15	spathulenol	5.11	5.49	4.97
16	β -eudesmol	1.25	1.08	-
17	α -cardinol	2.24	1.83	-
18	cyclododecane	8.02	6.45	10.53
19	hexadecanoic acid, methyl ester	1.86	1.48	2.06
20	hexadecanoic acid, ethyl ester	2.74	2.42	2.37
21	9,12-octadecanoic acid, methyl ester	1.26	1.60	2.21
22	9,12-octadecadienal	-	1.60	1.70
23	phytol	-	1.90	1.72
24	ethyl linoleate	4.11	3.77	3.63
25	7,10,13-hexadecatrienoic acid, methyl ester	3.16	3.02	2.90

Table 9. GC-MS analysis of essential oil extracted by steam distillation from Ciron peel.

No	compound	RI	authent ic RI	Treatment							
				2kg/cm ²		2.5kg/cm ²		3kg/cm ²		3.5kg/cm ²	
				5 M	60 M	5 M	60 M	5 M	60 M	5M	60 M
1	α -pinene	1011	1010	4.06	3.18	3.43	3.29	3.57	3.25	3.42	3.11
2	α -thujene	1025	1023	0.01	0.01	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	β -pinene	1086	1088	2.23	1.66	1.94	1.77	1.85	1.74	1.98	1.69
4	β -myrcene	1154	1156	7.05	5.79	6.12	5.90	5.88	5.96	6.16	5.80
5	d-limonene	1196	1196	52.6 5	53.69	51.66	51.11	55.39	51.12	57.44	51.56
6	β -pallandrene	1210	1213	2	3.38	3.01	1.83	-	1.77	2.11	1.99
7	γ -terpinene	1226	1223	17.1	14.02	14.36	11.92	14.18	15.06	14.53	14.13
8	cis-ocimene	1239	1238	0.58	0.45	0.44	2.93	0.47	N.D.	0.5	0.46
9	ρ -cymene	1252	1250	1.43	1.3	1.26	1.41	1.27	1.41	1.25	1.33
10	α -terpineolene	1263	1276	1.12	0.96	0.95	1.03	0.92	1.04	0.93	0.97
11	sabinene hydrate	1460	1463	0.05	0.01	0.04	0.06	0.04	0.04	-	0.04
12	linalool	1537	1537	4.07	4.17	5.83	5.25	5.64	5.93	4.74	5.58
13	β -cryophyllene	1564	1562	0.09	0.13	0.10	0.15	0.08	0.13	0.07	0.12
14	germacrene b	1571	1572	0.25	0.36	-	0.41	0.22	-	0.21	0.36
15	l-4-terpineol	1578	1591	0.23	0.33	0.26	0.51	0.38	0.56	0.29	0.50
16	β -farnescene	1639	1636	0.91	1.42	1.00	1.68	0.82	1.68	0.69	1.43
17	α -terpineol	1671		0.54	0.81	0.56	0.75	0.48	0.81	0.40	0.73
18	humulene	1673	1672	0.22	0.3	0.23	0.36	0.18	0.34	0.19	0.30
19	α -amorphene	1691	1692	0.02	0.04	0.01	0.05	-	0.04	-	0.04
20	cis, cis- α -farnescene	1699	1697	1.02	1.31	1.01	-	0.83	1.34	0.82	1.30
21	germacrene d	1721	1718	0.09	0.18	0.12	0.04	0.08	0.22	0.07	0.20
22	thymol	2098	2100	0.01	0.20	0.02	0.18	0.01	0.18	0.01	0.23

2. 유자 정유의 주향 성분의 결정

유자 정유의 주향 성분을 측정하기 위하여 정유 원액을 3배씩 희석하여 shifting test를 실시하여 FD₃ chromatogram을 작성하여 그림 1에 표시하였다. 초기 향인 α -pinene과 myrcene의 경우는 두 향이 분리되지 않고 거의 α -pinene이 끝나면서 myrcene의 향과 겹쳐 검출되고, FD-value도 같은 4(81배 희석시까지 검출됨을 의미)이어서 같이 표시하였다. 향 성분중 큰 FD-value를 보여주는 것은 linalool (FD=7)이었으며, 2000배 이상 정유 원액을 희석하여도 검출되었다. linalool은 다른 citrus fruit인 lemon의 경우 함량이 13인데 비하여 유자에는 약 10배인 113ppm이 들어 있다고 보고된 바도 있다. 따라서 유자의 향에 linalool이 크게 기여하는 것임에는 틀림없으나 유자 고유의 향에는 linalool이외에 다른 향이 반드시 필요하리라고 판단되었다.

냄새로 향성분을 동정하기 위하여 GC-sniffing test 결과와 GC-MS 자료를 분석하여 표 10에 나타내었다. 유자향을 결정하는 중요화합물로는 α -pinene (시원한 솔향), myrcene (꽃향), limonene (풀향, 매우 미약함), linalool(꽃향, 유자향, 유자의 주요 향성분: FD value=3⁷) 그리고 1,3,5-undecatriene(강한 자극, 유자향)으로 이들이 복합적으로 유자향을 결정하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 1,3,5-undecatriene의 경우 극성 column인 DB-wax에서는 다른 compounds와 RI값이 유사하여 peak 분리가 안되고, DB-5MS의 경우에도 정유 원액을 주입하여야만 검출이 가능할 정도로 함유량이 매우 작았다. 그러나 Ralf G. Berger등의 보고에 따르면 이물질의 threshold value가 보고된 non-terpenoid hydrocarbon 중에서 가장 적은 0.001-0.002ng으로 balsamis하며 pinewood한 향특성을 지니고 있다고 하였다.

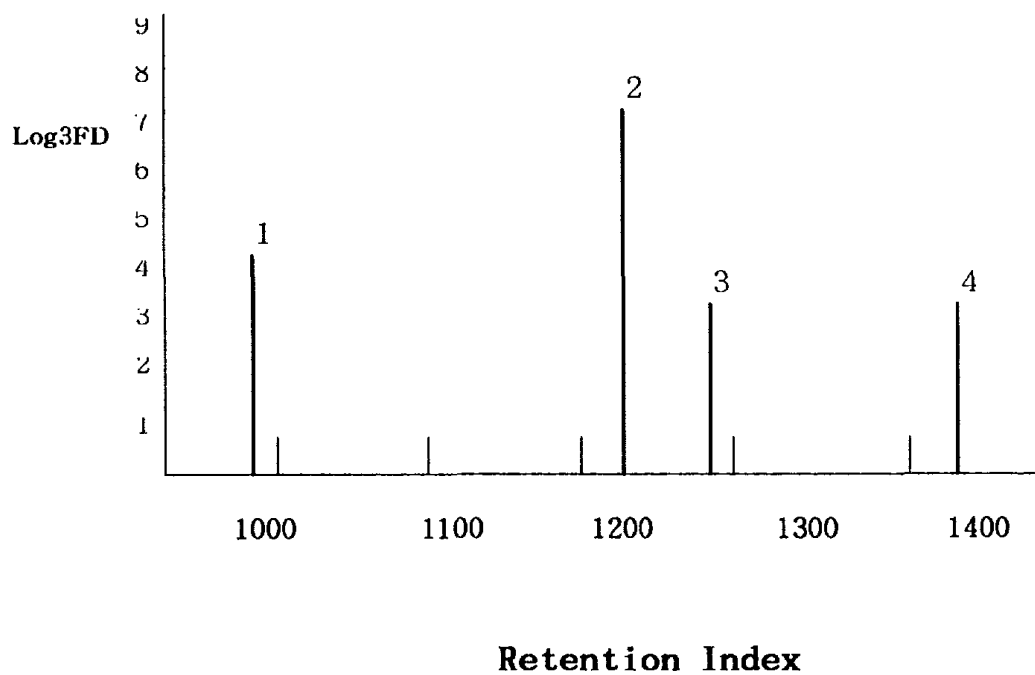


Fig.1. FD chromatogram of citron odor-active compounds of citron peel. 1 : α -pinene , 2 : linalool , 3. γ -terpinene , 4. 1,3,5 undecatriene

Table 10. Odor character compounds of citron essential oil.

column	RI	compound	characteristics
DB-Wax (polar)	1172	α -pinene	fresh, pine
	1154	myrcene	floral, plastic, sweet
	1186	limonene	very weak glass-like
	1120-1400	N.D.	sweet, floral, citron-like
	1537	linalool	mild, floral, sweet, citron-like
	1639	β -farnesene	mild, citrus
DB-5MS (non-polar)	980	α -pinene	pine, fresh
	1235	linalool	floral, sweet, citron-like
	1285	γ -terpinene	floral, citrus
	1440	undecatriene	strong, citron-like, acidic

3. 추출방법의 장단점 비교

초기 추출물의 관능적인 평가로는 수증기 증류에 의한 정유가 가장 좋은 향을 나타내었으나, 용매추출과 초임계 추출의 경우에는 수지(resin)나 색소 등이 함유되어 향성분의 관능적인 검출이 안될 수도 있으므로 모두 GC-MS 분석을 실시하였다. 초임계 추출의 경우는 액체 탄산가스의 특성처럼 비극성 성분의 함량이 매우 높은 것이 특징으로 나타났으나 유자향성분의 비중은 상대적으로 매우 낮은 값을 보여주었다. 용매추출의 경우는 유자향이라고 분석된 α -pinene, myrcene, limonene, linalool 등이 함유되어 있으나 이는 일반적으로 "oleoresin"이라 불리는 천연색소추출물의 형태로 각종 수지물질과 색소 그리고 정유성분의 혼합물로 구성되어 있기 때문에 향후 향제품을 개발하는데 장해요인으로 작용할 소지가 많아 정유 추출은 증류에 의한 것이 가장 좋은 것으로 판단되었다. 가장 우수한 추출방법을 선정하기 위하여는 각 추출방법의 장단점을 파악해야 하므로 본 실험과정에서 파악된 추출방법의 장단점을 요약하여 표 11에 표시하였다.

Table 11. Comparison of advantage and disadvantage of various citron oil production methods.

추출방법	장점	단점
용매추출법	1. 수율이 높다	<ol style="list-style-type: none"> 1. 건조 및 분쇄 과정이 필요하다 (냉동 건조) 2. 진공 농축 및 용매회수장치가 요구된다 3. 추출물에 색소등 다른 물질이 많다 (oleoresin) 4. 향성분이 우수하지 않다. 5. 시간이 많이 소요된다. 6. 공정이 건조, 추출, 용매제거의 3단계로 복잡하다.
초임계 추출방법	1. 수율이 다소 높은편	<ol style="list-style-type: none"> 1. 초기 설치비용이 많이 요구된다. 2. 추출물에 색소등 다른 물질이 많다. 3. 극성 향성분의 추출이 어렵다(유자에 사용하기에는 부적합)
steam 증류법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 무색의 정유를 얻을 수 있다 2. 정유의 향성분이 우수하다 3. 초기 전처리 과정이 필요없다 (생유자박을 바로 사용) 4. 정유 추출후 기열상태이므로 바로 펙틴 등의 기능성 물질제조공정에 이용할 수 있다(2차년도) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 수율이 낮다. (수지(resin) 및 색소 성분이 없기 때문에 전체무게로는 낮은 값을 보이나 순수 정유 양으로는 낮은 값이 아니다.)

제 4 절 펙틴 물질의 분리 및 특성 연구

1. 추출 조건의 최적화

가. 펙틴추출시 알콜세척 횟수의 결정

펙틴은 사용용도가 잼이나 젤리 등의 응고제 이외에도 식이섬유의 형태로 사용량이 증가하기 때문에 펙틴 속에 잔존하는 유리당은 펙틴을 겔화제가 아닌 기능성 식품으로 사용하고자 할 경우에는 될 수 있는 한 최소 농도로 존재하는 것이 바람직하다. 펙틴 속에 잔존하는 당의 제거는 대부분 펙틴제조시의 세척과정에서 이루어지기 때문에 세척단계별로 유리당의 함량을 분석하여 최저 수준의 당함량에 도달하는 세척단계를 설정하였다. 산 추출액에 2배 부피의 95% ethanol을 넣어 침전시킨 얻은 펙틴에 동 부피의 95%, 65% ethanol로 침전물을 세척하며, 세척액속에 잔존하는 당의 함량을 Molisch반응으로 측정하여 그림 2에 도식하였다. 측정되는 당 함량은 glucose를 이용하여 표준곡선을 작성한 후, glucose에 상당하는 양으로 계산하였다.

1회 세척액 속에 존재하는 당의 함량은 2.2~3.5 mg/ml의 농도였고, 3회 세척 시에는 0.2 - 0.4 mg/ml 의 농도로 당이 존재하였으며, 6회 이상 세척하였을 때, 0.2 mg/ml 이하의 농도이며 그 이후의 세척에도 더 이상 당 함량은 감소하지 않았기 때문에 펙틴 제조 시 세척과정을 6회로 정하고 이후 펙틴 분리 실험에 적용하였다.

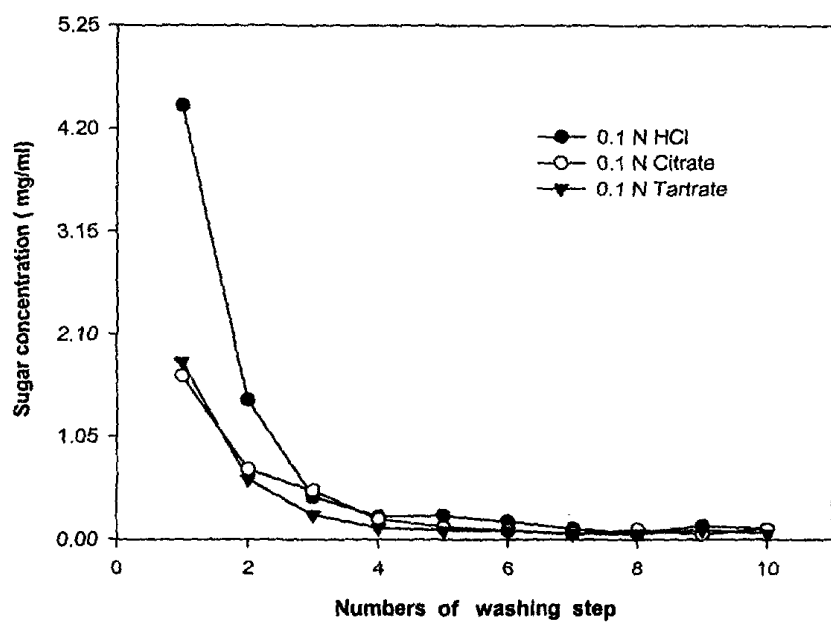


Fig 2. Residual sugar contents in acid extracts following washing step with 65 % ethanol after 95 % ethanol precipitation from citron peel

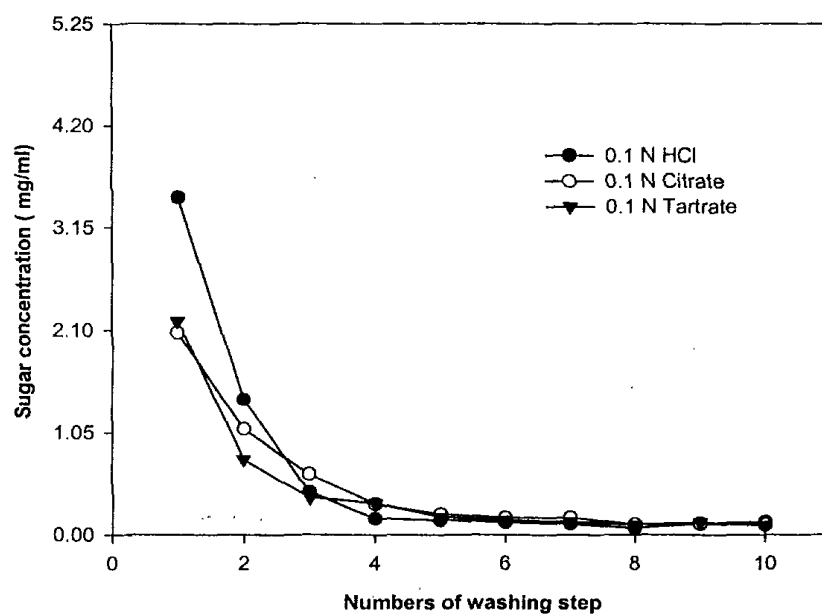


Fig 3. Residual sugar contents in acid extracts following washing step with 65 % ethanol after 95 % ethanol precipitation from heat-treated citron peel

나. 펙틴의 추출

(1) 펙틴 추출 방법

펙틴은 산처리 방법을 이용하여 추출하였다. 건조된 분말시료에 각각의 유기산(citrate, tartrate)과 무기산 (HCl)을 0.01 N, 0.05 N, 0.1 N, 0.5 N의 농도를 1:10, 1:20, 1:30, 1:40의 비율로 넣고 추출한 다음 추출된 용액을 원심분리하여 상등액을 취한 후 상등액의 2배에 해당하는 95 % Ethanol을 넣어 침전시켰다. 다시 원심분리하여 침전물만 얻은 후 당을 제거하기 위하여 2배에 해당하는 95% ethanol을 넣어 1회 세척하고 2배에 해당하는 65% ethanol을 넣어 5회 세척하였다. 이렇게 얻어진 침전물은 40 °C에서 건조한 후 100 mesh로 분쇄하였다.

(2) 생유자박으로부터 펙틴의 추출

여러 가지 산 처리 조건을 달리하면서 펙틴을 추출한 결과를 표 12에 제시하였다. 추출용매의 비율을 1:10, 1:20, 1:30, 1:40으로 추출했을 때 추출용매의 비율이 증가할수록 추출되는 펙틴의 수율도 증가하는 경향을 보여주고 있으나 1:20 이상의 추출비율인 경우는 추출 및 추출후의 펙틴 침전 그리고 세척과정에 요구되는 ethanol의 양을 고려할 때, 비경제적인 공정으로 판단되어 1:20의 비율이 가장 적당한 추출용매 비율로 판단되었다. 펙틴 추출에 사용한 산은 무기산으로는 HCl, 유기산으로는 citrate와 tartrate였는데 각각의 농도에 대한 펙틴의 추출수율을 분석해보면 1:20의 추출비율에서, HCl은 0.05 N에서 가장 높은 추출수율을 얻을 수 있었으나, 두 유기산은 모두 0.1 N의 농도에서 가장 높은 추출수율을 나타내었다. 동일한 농도로 추출수율을 비

교해보면 0.1 N의 농도를 기준으로 해서 HCl이 17.85 %으로 가장 높았으며 citrate는 15.60 %, tartrate는 11.36 %로 나타내었다. 산의 농도가 0.5 N 인 경우에는 HCl로 추출한 펙틴은 매우 검은 색을 나타내어 펙틴으로서의 사용이 어려울 것으로 판단되었으며, 유기산의 경우도 초기 추출액의 점도가 매우 높은 이유로 불용성 물질과의 분리가 어려워 정확한 수율을 계산할 수 없어 표 12에서는 자료를 제시하지 않았다. 본 실험의 결과를 기존에 보고된 다른 농산자원으로부터 추출한 펙틴의 수율과 비교하여 표13에 나타내었다. 펙틴물질을 추출하기 위하여는 크게 산 처리법과 polygalacturonase를 사용하는 효소적 처리법이 있는데, 표 13에서 보는 것처럼 산 처리에 의한 pectin의 추출 수율은 Erickson 등이 chelating agent로 CDTA를 사용한 경우를 제외하고는 대부분이 20% 이하의 수율을 보이고 있으며, 본 연구에서 얻은 15-19 % 내외의 펙틴 수율은 일반적인 산 처리법으로 얻은 추출 수율 보다는 다소 높은 결과이다.

(3) 정유추출후의 유자박으로부터 펙틴의 분리

정유를 폐유자박으로부터 추출한 후, 건조하여 상기 방법과 동일하게 펙틴을 추출한 결과를 표 14에 나타내었다. 생유자박을 사용하였을 때와 수율면에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 염산으로 추출하였을 때 약 17.7% 그리고 구연산으로 추출하였을 때 약 16.6%의 수율을 보여주었다.

Table 12. Extraction yield of pectin from citron peel in the various concentration of acids.

(%, DWB)

rati	HCl			Citrate			Tartrate		
	0.01 N	0.05 N	0.1 N	0.01 N	0.05 N	0.1 N	0.01 N	0.05 N	0.1 N
1:10	4.570	11.220	11.280	8.325	9.040	11.000	9.400	9.400	11.550
1:20	14.475	18.900	17.700	11.475	14.480	16.640	13.125	14.100	15.920
1:30	15.996	19.250	19.500	11.625	15.730	16.065	14.125	13.800	15.470
1:40	17.748	18.550	18.180	11.900	17.460	18.500	12.075	14.790	16.020

Table 13. Comparison of pectin extraction yield from various sources.

source	extraction method	yield (* DWB)
citron	0.1N HCl, citrate, tartarate	15-19
apple	0.05N HCl	8.0
tangerine	1N-HNO ₃	11.52
galgal	0.1N HCl	15.26
rapeseed	0.02 M CDTA in phosphate buffer at pH 6.5	26.0

Table 14. Extraction yield of pectin from heated-treated citron peel in the various concentration of acids.

(%, DWB)

rati	HCl			Citrate			Tartrate		
	0.01 N	0.05 N	0.1 N	0.01 N	0.05 N	0.1 N	0.01 N	0.05 N	0.1 N
1:10	4.215	7.840	8.625	4.470	4.905	6.980	4.960	5.700	7.500
1:20	9.225	18.675	17.850	8.925	11.410	15.600	7.950	9.980	11.360
1:30	11.160	19.125	18.850	8.520	13.625	15.600	7.875	9.60	11.440
1:40	11.484	18.200	17.675	6.290	13.650	15.840	8.050	10.37	10.800

2. 펙틴의 물리화학적 특성 분석

가. 추출된 펙틴의 수분, 회분함량 및 색도 측정

추출되어진 펙틴의 물리적 성질을 측정하여 표 15와 16에 나타내었다. 추출되어진 펙틴의 수분함량은 9.78 %에서 12.65 %의 범위로 나타내었으며 회분함량의 경우는 HCl로 추출한 펙틴은 1 % 미만의 회분함량을 보이고 있으나 유기산으로 추출한 펙틴은 상대적으로 높은 회분함량을 보이고 있으며, tartrate로 처리하였을 경우, 12.12 %의 가장 높은 회분 함량을 보이고 있으나 citrate로 추출한 펙틴은 약 5 % 내외의 회분함량을 보이고 있어 무기산보다는 유기산으로 펙틴을 추출하였을 경우 상대적으로 높은 회분함량을 함유하는 펙틴이 추출되었다. 펙틴의 색도를 측정한 결과, 밝기를 나타내는 L값은 모든 펙틴 추출물이 유사한 값을 보이고 있으나 a 와 b 값의 경우는 HCl을 처리한 펙틴의 경우가 유기산을 처리한 펙틴보다 높은 값을 보여주었고, 관능적으로도 HCl로 추출한 펙틴보다는 유기산으로 추출한 펙틴이 더 밝은 색을 나타내었다.

나. 펙틴의 분자량 측정

추출된 펙틴의 Intrinsic viscosity를 측정하여 평균분자량을 측정하여 그림 4,5 그리고 표 17에 나타내었다. 추출된 펙틴의 농도를 각각 다르게 하여 Cannon-Fenske capillary viscometer를 이용하여 측정하여 얻어진 Intrinsic viscosity의 값과 이것을 이용하여 얻은 평균분자량은 는 80,000 - 113,000 의 분자량 범위를 보여주고 있다. 유자로부터 분리한 펙틴은 이 등의 보고한 사과펙틴의 평균분자량이 15,000이고, 문 등의 보고에 의하면 감귤펙

틴의 평균분자량이 84,000인 것에 비하면 유자박으로부터 분리한 펙틴은 분자량이 작았다. 1차 연도 과제에서 부산물로 남게되는 (폐유자박으로부터 정유를 추출하고 남은 유자박을 건조하여 분쇄한 다음 생유자박의 경우와 동일하게 펙틴을 추출한 결과 이 경우에는 분자량이 50,000 미만의 펙틴을 얻을 수가 있었다.

Table 15. Analysis of pectin prepared in the experiment.

	A			B		
	HCl	Citrate	Tartrate	HCl	Citrate	Tartrate
Moisture	12.24	11.54	11.03	12.21	12.65	9.78
Ash	0.5972	6.7879	12.1174	0.4165	5.8742	4.8951

Table 16. The Hunter color values of citrus pectin powder.

Hunter color values	A			B		
	HCl	Citrate	Tartrate	HCl	Citrate	Tartrate
L	70.70	76.58	81.40	58.45	78.58	79.97
a	3.59	2.20	1.52	5.62	0.80	1.12
b	16.38	15.91	12.08	25.84	21.35	13.77

L : brightness a : red saturation index b : yellow saturation index

A : pectin extracted from citron peel

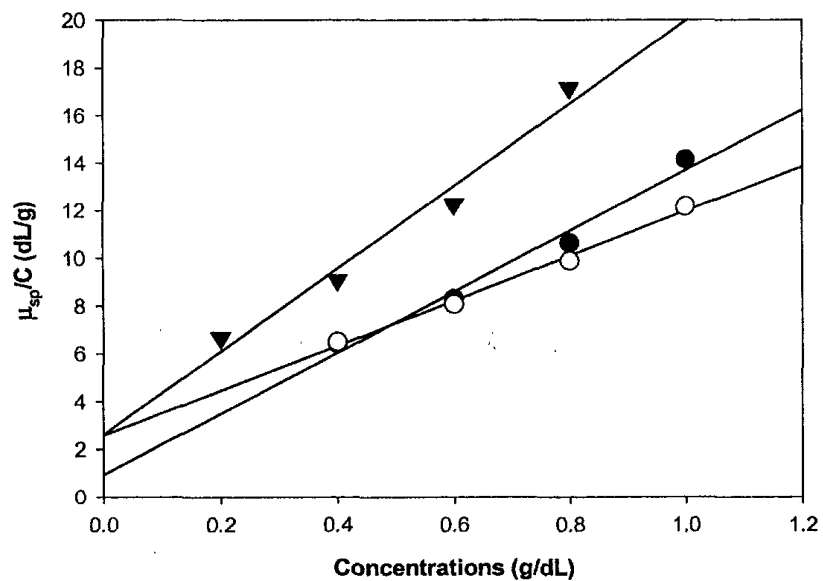


Fig. 4. Determination of the intrinsic viscosity of pectin prepared from citron peel. The symbols indicate the pectin which was extracted from citron peel in 0.1 N HCl(●), 0.1 N citrate(○), 0.1 N tartrate(▼).

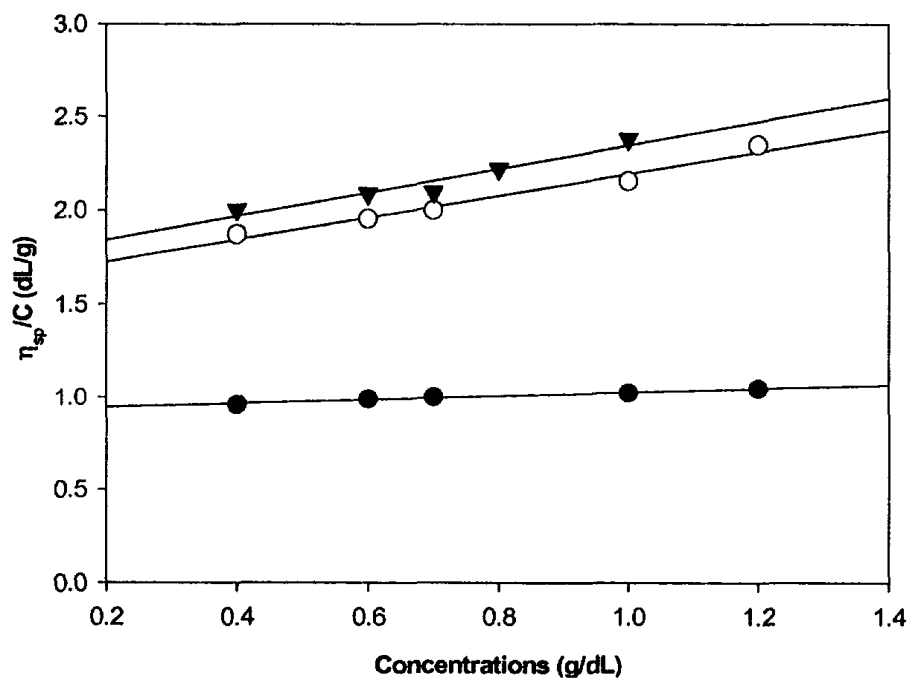


Fig. 5. Determination of the intrinsic viscosity of pectin prepared from heat-treated citron peel. The symbols indicate the pectin which was extracted from citron peel in 0.1 N HCl(●), 0.1 N citrate(○), 0.1 N tartrate(▼).

Table 17. Comparison of intrinsic viscosity, molecular weight on extracted pectins.

	A			B		
	HCl	Citrate	Tartrate	HCl	Citrate	Tartrate
intrinsic viscosity	0.3124	0.343	0.2618	0.0923	0.1633	0.1744
molecular weight	1.0×10^5	1.13×10^5	8.0×10^4	2.14×10^4	4.40×10^4	4.78×10^4

A : Extracted pectin from citron peel

B : Extracted pectin from refined-oil of removed from citron peel

다. 펙틴의 순도, methoxyl 함량

분리된 펙틴의 AUA(anhydrouronic acid) 및 methoxyl 함량을 표 18에 나타내었다. AUA 함량은 HCl로 추출할 경우 64.24 %, citrate는 49.79 % 그리고 tartrate의 경우는 47.96 %로 높은 함량을 보여주고 있다. Methoxyl 함량을 기준으로 계산된 펙틴의 DE 값은 모든 추출된 pectin이 40-47%의 값을 보여주고 있어 low methoxyl pectin으로 분류될 수 있다. 이는 생유자박이나 정유 추출후의 유자박이나 모두 비슷한 함량을 보이고 있었다.

라. 펙틴의 당조성

분리된 펙틴의 당 조성을 표 19에 나타내었다. arabinose의 경우 무기산으로 추출한 펙틴의 경우가 유기산으로 처리한 펙틴보다 함량이 크게 적은 것을 제외하고는 비슷한 조성을 보여주고 있으며, 본 연구결과도 lemon 펙틴의 경우와 유사하게 xylose의 함량이 매우 낮게 관찰되었는데, 이는 감귤류 펙틴의 일반적인 경향으로 판단된다. Rhamnose 함량은 4 % 내외이며, rhamnose의 함량은 펙틴의 생리활성 기능과 매우 밀접한 관계를 가지고 있고, 최근 들어 rhamnogalacturonan에 대한 연구가 활발히 진행되고 있기 때문에 본 연구에서 분리된 펙틴도 향후 생리활성 기능을 탐색하는 물질로의 연구가 필요하다고 할 수 있다.

결론적으로 본 연구는 유자 가공 시 부산물로 처리되는 유자박을 이용하여, 펙틴물질을 추출하였으며, 펙틴 추출 수율은 분리조건에 따라 15 - 19% 이고, 분자량은 4,000에서 11,000 정도이며, 45% 전후의 DE 값을 가지는 low methoxyl pectin을 추출할 수 있었다.

Table 18. Chemical composition of original pectin and extracted pectins.

component	control	A			B		
		HCl	Citrate	Tartrate	HCl	Citrate	Tartrate
AGA (% (w/w))	68.16	64.24	49.79	47.96	41.21	54.18	39.13
Methoxyl (% (w/w))	5.69	5.38	3.87	3.63	2.97	4.05	2.93
DE (%)	47.40	47.55	44.13	42.97	40.92	42.44	42.51

A : Extracted pectin from citron peel

B : Extracted pectin from refined-oil of removed from citron peel

Table 19. Sugar composition of pectins.

carbohydrate residues	citron peel			heated-treated citron peel		
	HCl	citrate	tartrate	HCl	citrate	tartrate
arabinose	2.3	15.7	15.2	1.2	19.0	15.0
rhamnose	4.7	4.6	3.8	4.2	6.2	5.4
xylose	1.4	-	-	1.6	-	-
glucuronic acid	6.0	4.4	5.8	5.5	5.5	4.9
galacturonic acid	50.6	57.4	54.3	38.7	44.9	34.0
galactose	18.4	8.5	11.7	16.0	11.2	11.6
glucose	16.6	9.4	9.2	32.8	13.2	29.1
Rha:GalA	0.09	0.08	0.07	0.11	0.14	0.16

제 5 절 유자박으로부터 식이섬유의 제조

1. 식이섬유 제조 조건

생유자박과 정유 추출후의 유자박으로부터 효소를 사용하여 식이섬유를 불용성과 수용성으로 나누어 분리하였다. 분리하는 방법은 폐유자박속에 존재하는 당 및 단백질을 amylase와 proteinase 그리고 glucoamylase로 분해하여 제거한 후 분해물을 알콜로 세척하여 최종 불용성 식이섬유를 얻었으며, 불용성 식이섬유를 증류수에 용해하여 용해되는 부분을 수용성 식이섬유로 얻었다(그림 6,7). 추출된 각 식이섬유의 양은 아래 식에 근거하여 계산하였다.

○ 불용성 식이섬유

$$\text{IDF}(\%) = \text{mg residue} - (\text{mg protein} + \text{mg ash} - \text{blank}) \times 100 / \text{mg sample}$$

○ 수용성 식이섬유

$$\begin{aligned} \text{SDF}(\%) &= \text{mg residue} - (\text{mg protein} + \text{mg ash} - \text{blank}) \times 100 / \text{mg sample} \\ - \text{Blank} &= \text{ash} - \text{protein} - \text{mg residue} \end{aligned}$$

2. 식이섬유의 분석 및 제조

생유자박으로부터 불용성 식이섬유는 29.78%, 수용성 식이섬유는 15.73%를 얻을 수 있었고, 정유추출후의 유자박으로부터는 불용성 식이섬유를 35.07%, 수용성 식이섬유는 12.57%를 얻었다.(표 20). 제조된 식이섬유에 함유된 각 조성유의 조성은 표 21에 나타내었다. 제조된 식이섬유는 분말상태에서 쥐에

대한 전임상실험을 실시하였고, 시제품을 제조하기 위하여 tablet(0.40g/tablet)을 제조하였다(그림 8).

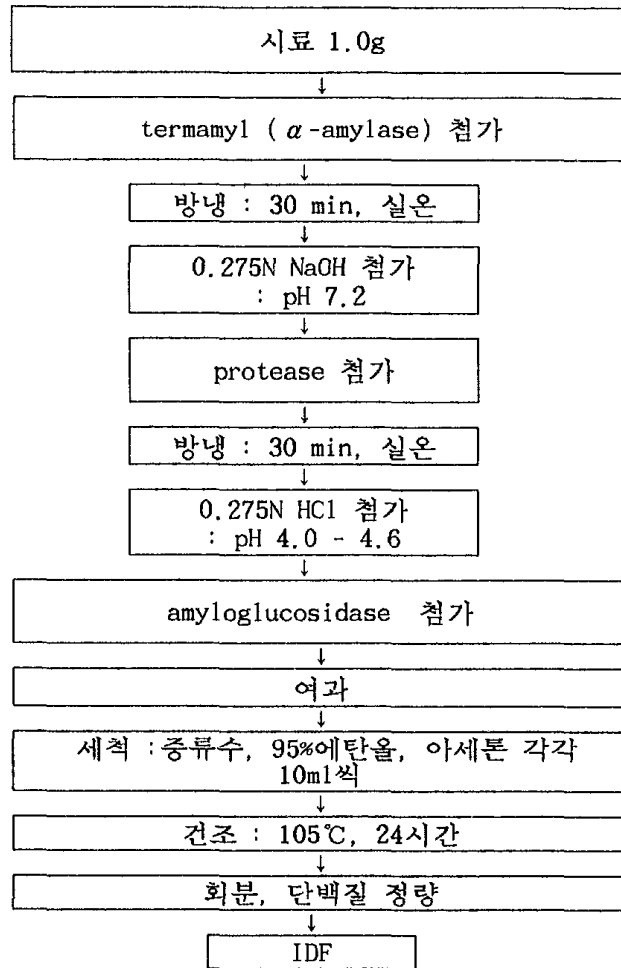


Fig. 6. Schematic diagram of preparing of insoluble dietary fiber

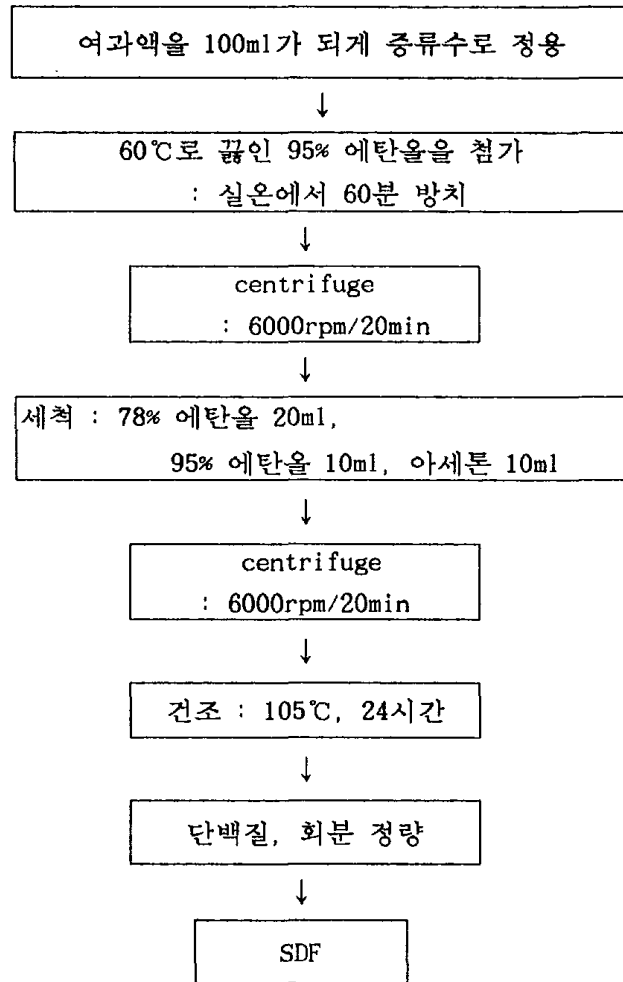


Fig. 7. Schematic diagram of preparing of soluble dietary fiber

Table 20. Compositinal analysis of dietary fiber prepared in this experiment from Citron peel.

Samples	Analysis		
	Insoluble dietary fiber(%)	Soluble dietary fiber(%)	Total dietary fiber(%) ¹⁾
Citron peel	29.78	15.73	45.51
Heat-treated citron peel	35.07	12.57	47.64

Table 21. Contents of acid detergent fiber, neutral detergent fiber, lignin, cellulose and hemicellulose in dietary fibers prepared in this experiment.

(dry weight base)

Analysis	Samples	
	Citron peel	Heat-treated citron peel
Acid detergent fiber	5.86	6.58
Neutral detergent fiber	21.86	29.17
Lignin	2.75	3.67
Cellulose	3.11	2.91
Hemicellulose	16.00	22.59

A

B

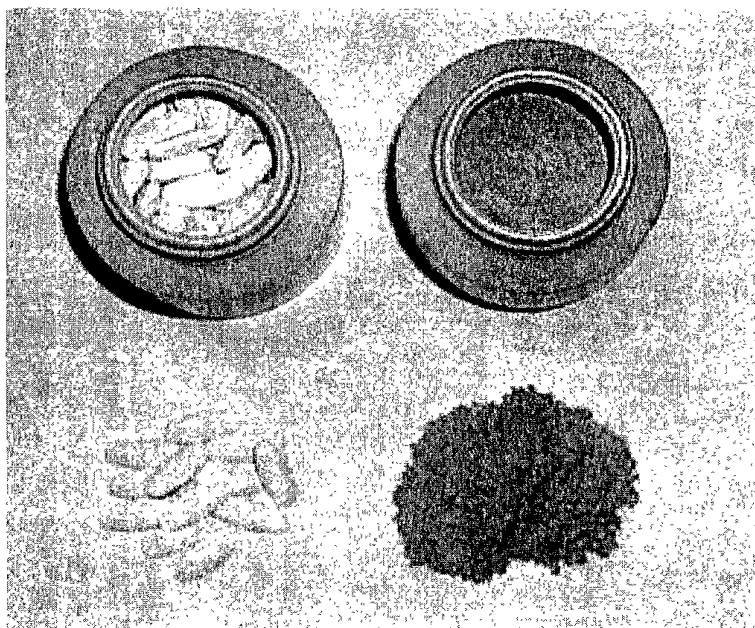


Fig. 8. Photograph of the dietary fiber powder (B) and dietary fiber tablet(A)

제 6 절 유자정유를 이용한 기능성 향비누의 제조

1. 천연 향비누 제조

가. 증류에 의한 유자 정유의 추출

2.5kg_r/cm²(128℃)에서 30분간 분쇄한 생유자박으로부터 유자 정유를 추출하였다. 착즙후의 유자박의 수분함량이 약 80%이기 때문에 유자박 1kg으로부터 얻을수 있는 유자 정유의 양은 약 2.4 - 2.5 ml이므로 비누를 제조하기 위하여 필요한 양의 정유를 확보하기 위하여 약 100kg의 유자박을 증류하여 200ml 정도의 유자 정유를 얻어 비누 제조에 사용하였다.

나. 유자박으로부터 색소의 추출

유자박 분말을 용매를 사용하여 항온진탕기에 일정시간 추출한 후 원심 분리하여 상등액을 취하여 진공원심분리기로 40℃에서 용매를 제거한 다음 일정량의 dichloromethane에 용해시키어 색소를 정량하였다. 유자박으로부터 추출된 색소의 총함량은 β-carotenoid 함량으로 환산하였으며, 검량선은 β-carotene 표준(β carotene, from carrot, Sigma사) 15mg을 dichloromethane 100mL로 녹인 후 이용액을 희석하여 448nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정한 후 작성하였다. 색소추출을 위한 용매로는 methanol, hexane 그리고 dichloromethane을 사용하였다. 그러나 methanol의 경우 색소추출 후, 농축물의 용매에 대한 용해성이 매우 낮아 사용에 문제점으로 대두될 소지가 있으므로 hexane과 dichloromethane만을 사용하였다. 용매추출의 최적은

도를 결정하기 위하여 20℃에서 50℃까지 10℃간격으로 온도 구간을 나누어 최적 추출온도를 결정한 후, 최적온도에서 용매의 사용량을 결정하기 위하여 용매사용 비율을 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20(w/v)으로 조절하여 최적 용매 사용비율을 결정하였다. 이후 최적온도와 용매 비율에서 추출시간에 따른 색소추출량을 결정하였다.

최적 용매비율, 온도 그리고 시간이 결정된 후 색소추출후의 잔유물을 반복적으로 동일조건으로 색소가 추출되지 않을 때까지 추출하여 최적 추출단수를 구하였다. 사용한 용매중 dichloromethane의 경우가 추출수율이 우수하였고, 추출 조건은 20℃에서 유자:용매의 비율을 1:2로 하고, 2-5분간 추출하고, 이를 6회 반복하여 (추출단수는 6)회수하는 것이 가장 바람직하였다. 추출한 색소의 성분을 분석하기 위하여 추출된 색소의 absorption spectrum을 400nm에서 600nm까지 측정하여 표준 β -carotene의 것과 비교한 결과 추출된 색소 성분은 β -carotene을 주 성분으로하는 색소임을 알 수 있었고 (그림 9), 그리고 추출색소의 색도를 Hunter 색차계를 사용하여 Hunter L, a, b값을 측정하여 표준 β -carotene의 것과 비교하였다(표 22).

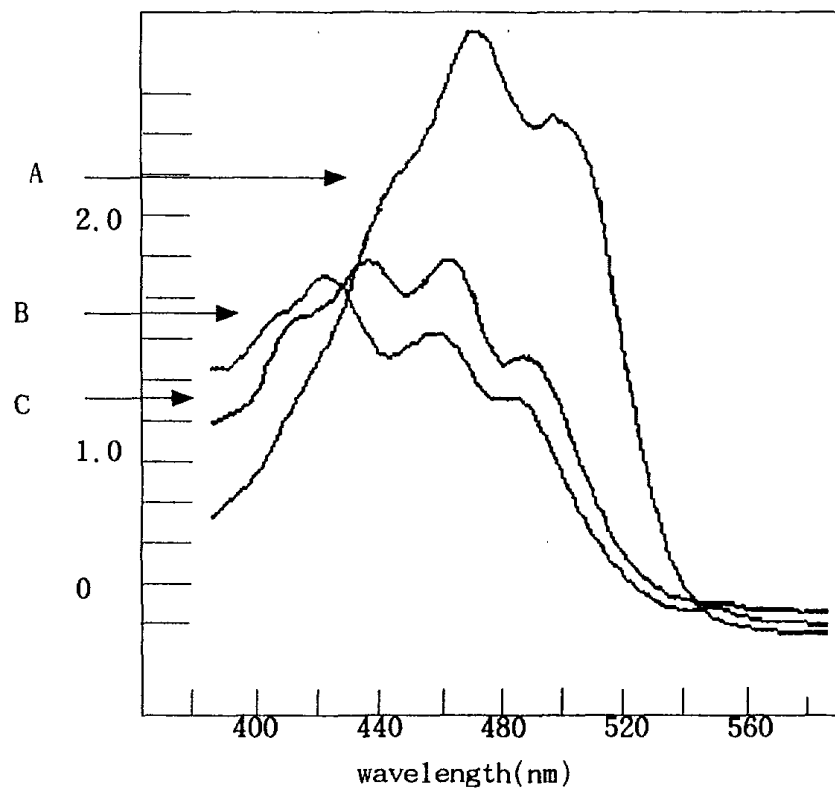


Fig. 9. Absorption spectrum of pigments extracted by solvent from Citron peel. A: standard, B : dichloromethane extracted pigments, C: hexane extracted pigments

Table 22. Spectral maxima and Hunter value of carotenoids extracted from citron peel.

solvent used for extraction	spectral maxima	L	a	b
standard	436, 460, 486	23.91	-0.62	+13.90
dichloromethane	416, 450, 474	23.18	-0.39	+4.53
hexane	428, 454, 476	24.11	-2.44	+13.48

나. 투명 향비누의 제조

본 과제에서 지향하는 비누의 기능은 아로마 테라피 효과를 발휘할 수 있으며, 투명하여 기존 비누와는 다른 향비누로서의 외관을 충분히 갖추고, 최종적으로 보습성이 뛰어난 비누를 제조하는 것이다. 이상의 목적을 충분히 달성하기 위하여 유자 정유자체로 충분히 아로마 테라피의 효과를 거둘 수는 있지만 그 외의 기능성을 부여하기 위하여 보습성이 뛰어난 키토산(CM-chitosan)을 최종 농도가 0.1%가 되도록 첨가하였다. 또한 유자박으로부터 분리한 식물성 비타민 A인 카로틴을 첨가하여 노란색의 투명 비누를 제조하였다. 본 과제에서는 2 종의 투명 유자 비누를 제조하였으며, 이들을 현재 시판되는 유자 비누와 비교하여 그림 10에 나타내었다. 비누 제조공정은 먼저 비누 구성분으로서 coconut fatty acid(17-22%), palm fatty acid(21-26%), NaOH(10-15%), triethanolamine(23-33%), D-glucitol(10-15%), glycerol(2-4%), mineral oil(1-2%), CDEA(1-2%), BHT(0.1%), EDTA-Na(0.1%), distilled water(5-7%)를 함량별로 첨가하여 110-120℃의 온도에서 증탕하면서 충분히 교반한 다음, 어느 정도 온도가 내려간 다음, 유자 정유, CM-chitosan 그리고 유자 카로틴을 첨가하여 굳힌다. 굳은 투명 비누를 커팅하여 속에 “농림기술개발 연구과제 시제품”이라고 labeling된 스티커를 삽입한 다음, 성형하고 랩핑하여 포장하였다. 최종 비누의 물성은 표 23에 나타내었다.

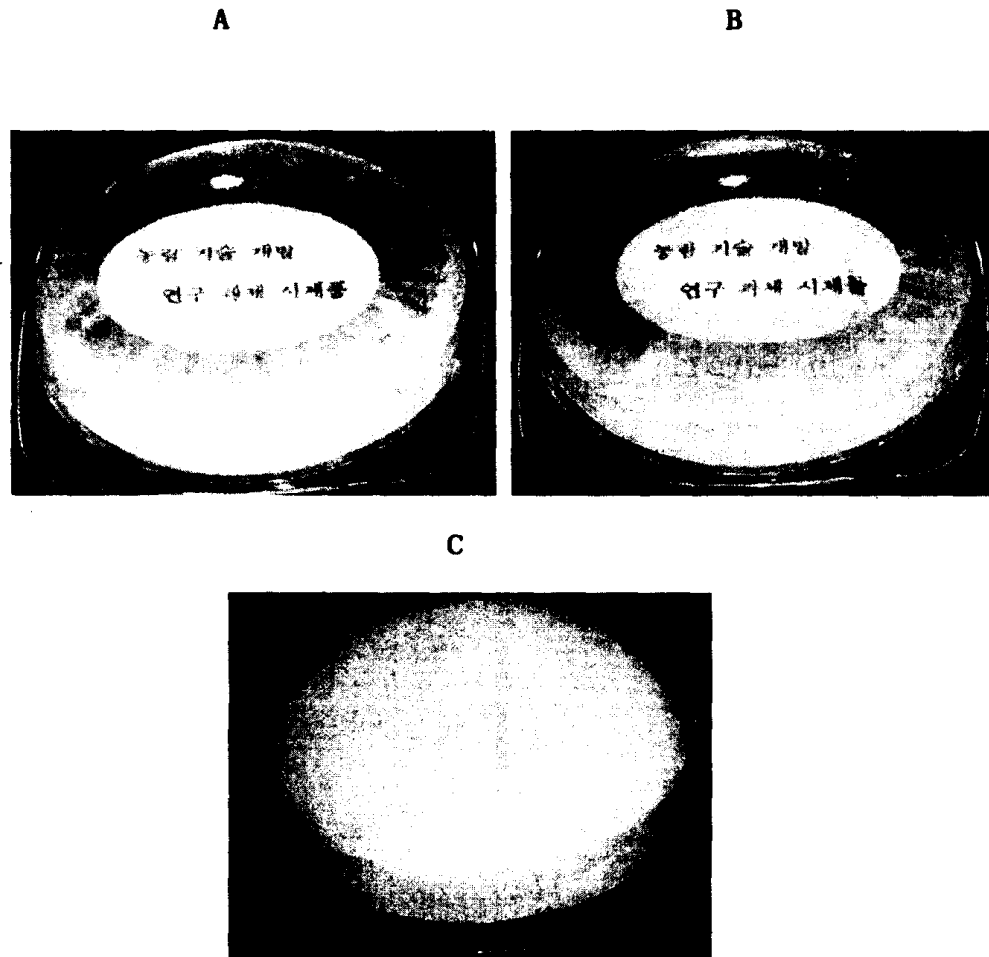


Fig. 10. Comparison of shape and color between commercial soap(c) and transparent soap manufactured in this project.

A: soap containing Citron essential oil and CM-chitosan

B: soap containing Citron essential oil, CM-chitosan and β -carotene

Table 23. comparative specifications of transparent soap.

properties	content
moisture(%)	10-15
melting point (degree)	59-70
pH(10% solution)	8.5-9.5
acid value	230-245
total fatty matter	50-60

제 7 절 식이섭유의 혈중 콜레스테롤 저하 기능 분석

1. 체중 증가에 미치는 식이섭유의 효과

가. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 Sprague Dawley계의 5주령 수컷 흰쥐 40마리를 조선대학교 실험동물센터에서 10일 동안 기본식으로 적응시킨 후 체중 평균 100 ± 10 g인 것을 난괴법에 따라 표 24와 같이 정상군, 고콜레스테롤식이 급여군, 고콜레스테롤 식이와 0.05% 및 0.25% 시료 급여군 등 4군으로 나누어 6주간 사육하였다. 고콜레스테롤혈증 유발식은 AIN-93을 기준으로 조제된 사료에 1% 콜레스테롤과 0.25% 콜산나트륨을 첨가하여 조제하였다. 물 및 시료(0.05 및 0.25%)은 제한없이 공급하였고 사육실 온도는 $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며, 조명은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 최종 체중에서 실험개시 전의 체중을 감하여 실험개시 전의 체중으로 나누어 체중증가율로 표시하였다

나. 체중 증가율 및 간장의 무게

흰쥐의 체중 증가율은 각 주에서 각 군간에 차이를 보이지 않았으나 간장/체중 비율은 콜레스테롤 무첨가식이 급여군이 식이섭유 및 콜레스테롤 첨가식이 급여군에 비하여 월등히 낮았으며 여타 실험식이 급여군들 사이에는 유의적인 차가 없었다(표 25). 본 실험에서 간장/체중 비율이 식이섭유 및 콜레스테롤 첨가식이 급여군이 콜레스테롤 무첨가식이 급여군보다 높은 것은 콜레스테롤 식이로 인해 간장 중에 콜레스테롤 및 중성지질 등이 축적되어 증가된

것으로 생각되며, 식이 중 과량의 콜레스테롤이 간장내로 유입되었을 때 지질 수용체인 apoprotein과 결합되어 lipoprotein형태로 배출되지 못하면 지방간 및 간세포 손상을 일으킬 우려가 있다.

Table 24. Experimental diet composition (%)

Group ¹⁾	Diet composition
Normal	Basal diet ¹⁾
Control	Basal diet + cholesterol(1.00%) + sodium cholate(0.25%)
E1	Basal diet + cholesterol(1.00%) + sodium cholate(0.25%) + E1 ²⁾
E2	Basal diet + cholesterol(1.00%) + sodium cholate(0.25%) + E2 ³⁾

¹⁾ According to AIN-93 diet composition

²⁾ E1 :

³⁾ E2 :

Table 25. Weight gain and liver/weight ratio in rats fed high cholesterol diet

Groups	Growth rate ²⁾						Liver/Weight ³⁾
	1	2	3	4	5	6	
Normal ¹⁾	1.21 ± 0.02 ^a)	1.50 ± 0.06 ^{a)}	1.82 ± 0.04 ^{ac})	2.11 ± 0.02 ^a)	2.48 ± 0.04 ^{a)}	2.84 ± 0.10 a)	2.73 ± 0.11 ^{a)}
Control	1.20 ± 0.02 ^a)	1.50 ± 0.03 ^{a)}	1.75 ± 0.03 ^{a)}	2.27 ± 0.04 ^a)	2.78 ± 0.04 ^{b)}	2.93 ± 0.05 a)	3.73 ± 0.06 ^{b)}
E- I	1.25 ± 0.01 ^a)	1.60 ± 0.03 ^{ab})	2.19 ± 0.05 ^{bc})	2.43 ± 0.07 ^b)	2.82 ± 0.04 ^{b)}	2.94 ± 0.03 a)	3.25 ± 0.20 ^{ab})
E- II	1.28 ± 0.01 ^a)	1.69 ± 0.03 ^{b)}	2.03 ± 0.05 ^{bc})	2.50 ± 0.12 ^b)	2.74 ± 0.03 ^{b)}	2.92 ± 0.04 a)	3.51 ± 0.20 ^{ab})

1) See the legend of Table 1

2) Growth rate (W_1/W_0) : Ratio of the body weight (W_1) to initial body weight (W_0)

3) Mean ± SE(n=10) , Values with different superscripts in the same row are significantly different($p < 0.05$) between groups by Tukey(T) test.

2. 유자 식이섬유가 혈중 콜레스테롤 함량에 미치는 영향

가. 실험동물의 처리 및 분석

(1) 실험동물의 처리

6주간 사육한 흰쥐를 16시간 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취하여 개복한 후 복부대동맥에서 채혈하고 실온에서 30분간 방치한 다음 600×g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻어 지질측정용 시료로 사용하였다. 간은 적출하여 생리식염수로 세척 후 여지로 물기를 제거하여 중량을 측정하였다.

(2) 혈청 지질의 분석

혈액중의 중성지질, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤함량은 Cholestech L·D·X(Cholestech Cooperation, U.S.A.)를 이용하여 측정하였고, 인지질농도는 Eng와 Noble의 방법(18)으로 조제된 kit(Wako Co., 일본), 유리콜레스테롤농도는 kit(Eiken Co., 일본)를 사용하여 측정하였으며, 콜레스테릴 에스테르농도는 총 콜레스테롤 농도에서 유리콜레스테롤 농도를 뺀 값으로 측정하였다. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법으로 측정하였다.

(3) 간 지질의 분석

간시료의 지질성분의 추출을 Folch와 Less의 방법을 변형하여 사용하였다. 총지질의 함량은 추출된 간 1g에 chloroform : methanol(2 : 1, v/v)용매

를 가하여 homogenizer로 균질화하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 chloroform층을 수거한 후, 남은 간시료를 다시 chloroform을 가해 원심분리하여 3 mL의 chloroform을 수기에 옮겨 6mL을 감압건조한 후 총지질 함량을 구하였다. 간의 중성지질, 총콜레스테롤, HDL, 인지질 등 지질의 측정은 감압 건조된 총지질을 3mL의 chloroform으로 녹여 용해한 후 혈청 중 지질 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

(4) 통계처리

실험결과는 SAS package를 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 표시하였고, one way ANOVA분석 후 각 군간의 평균치의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Tukey's test에 의해 검정하였다.

나. 유자 식이섭유의 혈중 콜레스테롤 저하 기능 분석

(1) 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤 및 인지질 농도

고콜레스테롤식이와 시료 농도 수준을 달리하여 급여한 흰쥐의 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤 및 인지질 농도는 표 26과 같다. 고콜레스테롤혈증은 동맥경화증의 지표로 소장에서 중성지방의 합성과 chylomicron의 분비증가, 간장에서 중성지방의 합성증가, VLDL-과 LDL-콜레스테롤합성과 분비증가, HDL-콜레스테롤의 합성 저하 및 lipase의 활성 감소로 유발되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 고콜레스테롤식이 급여군의 혈중 총콜레스테롤 농도는 정상군에 비하여 230%정도 현저한 증가를 나타내었는데 이 결과는 김 등의 보고처럼 식이 콜레스테롤에 의한 간장내 유리콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테

르의 축적이 일어났기 때문으로 추정되어진다. 본 실험에서 시료 급여군의 경우 고콜레스테롤식이 급여군에 비하여 각각 약 64%, 70% 이상 총콜레스테롤 농도가 낮은 것도 상기와 유사한 결과로 생각된다. 혈청 중성지질의 합성을 위한 지방산 공급원은 피하지방으로부터 유출된 지방산, 간세포내에서 합성된 지방산 및 chylomicron remnant중의 중성지질에서 가수분해된 지방산 등으로써, 이들의 공급으로 인해 농도가 월등히 높아지며 또한 모세혈관벽에 존재하는 lipoprotein lipase가 chylomicron과 VLDL의 분해를 촉진시킬때 감소되는 것으로 보고되고 있는데 본 실험에서는 시료 급여로 중성지질농도의 감소는 나타내지는 않았으나 감소하는 경향을 나타냈다. 고지방식으로 인한 지방간 발병의 주된 원인은 인지질 합성의 감소로 인한 것으로 보고되고 있는데, 본 실험에서 시료 급여시 대조군에 비하여 유의하게 증가되었음은 시료가 지방간 진행을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 예방할 수 있을 것으로 여겨진다.

Table 26. Serum concentrations of triglyceride, total cholesterol and phospholipid in rats fed high cholesterol diet

Group ¹⁾	Triglyceride	Total cholesterol	Phospholipid
	Concentrations(mg/dL)		
Normal	41.99 ± 3.75 ^{a)}	128.90 ± 12.03 ^{a)}	248.95 ± 27.29 ^{a)}
Control	55.60 ± 8.14 ^{b))}	424.58 ± 40.37 ^{b)}	193.39 ± 26.62 ^{b)}
E- I	46.54 ± 2.54 ^{ab)}	128.16 ± 16.68 ^{a)}	236.75 ± 23.39 ^{a)}
E- II	40.11 ± 5.99 ^{a)}	151.10 ± 9.77 ^{a)}	277.05 ± 31.84 ^{ab)}

1) See the legend of Table 1.

2) Mean ± S.E. (n=10).

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

(2) 혈청의 유리콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 농도

표 27에는 고콜레스테롤식이와 시료 농도 수준을 달리하여 급여한 흰쥐의 혈청 중 유리콜레스테롤, 콜레스테릴 에스테르 농도 및 콜레스테릴 에스테르의 비율이 나타나 있다. 혈액 중 대부분의 콜레스테롤은 소장에서 흡수되어 80%정도가 지단백의 지방산과 결합하여 콜레스테릴 에스테르 형태로 점막세포에 존재하고 나머지는 대부분 유리형으로 존재한다. 사람에게 있어서 총콜레스테롤에 대한 콜레스테릴 에스테르의 비는 약 70% 전후가 정상적인 것으로 알려져 있으며, 콜레스테릴 에스테르의 저하는 간질환 진단에 있어서 중요한 지표가 되며, 고콜레스테롤혈증일 때 상승되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 시료 급여군의 유리콜레스테롤 농도는 대조군에 비하여 감소의 경향을 나타냈으나 유의적인 효과는 아니었다. 반면 콜레스테릴 에스테르 농도는 시료 급여군이 대조군에 비하여 각각 76%, 68%의 현저한 감소를 나타내었고 콜레스테릴 에스테르의 비율도 약 11%, 20%정도 감소되어 정상군의 비율로 회복되었는데 이 결과와 Table 3에서 인지질 농도의 증가를 관련지어 볼 때 시료가 고콜레스테롤혈증의 개선 및 예방에 유효할 것으로 여겨진다.

Table 27. Serum concentrations of free cholesterol, cholesteryl ester and cholesteryl ester ratio in rats fed high cholesterol diet

Group ¹⁾	Free cholesterol	Cholesteryl ester	Cholesteryl ester ratio(%) ²⁾
	Concentrations(mg/dL)		
Normal	29.66 ± 2.90 ^{a)}	99.24 ± 15.79 ^{a)}	76.9
Control	35.62 ± 4.74 ^{a)}	388.96 ± 42.39 ^{b)}	92.4
E- I	35.49 ± 2.65 ^{a)}	92.67 ± 21.69 ^{a)}	72.3
E- II	28.11 ± 2.28 ^{a)}	122.99 ± 18.39 ^{a)}	81.3

1) See the legend of Table 1.

2) Cholesteryl ester ratio(%) : Cholesteryl ester / Total cholesterol × 100

3) Mean ± S.E. (n=10).

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

(3) 혈청 LDL-, HDL-콜레스테롤, HDL-C/TC비 및 동맥경화지수

시료와 고콜레스테롤식이를 환쥐에 6주간 급여시 혈청 중 LDL- 및 HDL-콜레스테롤의 농도, HDL-C/TC 비와 동맥경화지수에 미치는 영향을 나타낸 결과는 표 28과 같다. 혈청 LDL-콜레스테롤농도는 시료 급여군이 대조군에 비해 약 72%, 70%정도 감소되어 유의적인 변화를 나타냈으며 정상군의 농도에 근접하였다. 고콜레스테롤혈증은 혈액 중의 지단백 농도조절이 중요한 요인이다. 혈액중의 지단백 생성율과 제거율의 균형은 정상 상태하에서는 일정하게 유지되는데, 어떤 원인으로 인하여 균형이 깨어질 경우 간에서 혈액으로 운반되는 LDL-콜레스테롤 농도가 다량 증가되어 혈관벽에 축적되고 동맥경화증이 수반되는 고콜레스테롤혈증이 유발된다고 알려져 있다. LDL산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 하며 산화된 LDL이 산화가 안된 LDL보다 대식세포에 의해 더 잘 포획되어 foam cell을 형성하여 동맥경화를 유발한다고 보고되었다. 반면, 아직도 HDL-콜레스테롤의 동맥경화 및 혈관장에 개선에 대한 기전은 논의의 대상이지만 말초조직 및 혈액중에 축적된 콜레스테롤을 이화, 제거하여 콜레스테롤 에스테르로 만들고 간으로 역수송을 촉진하며 담즙산으로 배설시키므로써 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시켜 동맥경화증의 개선 및 예방에 유효한 것으로 알려져 있으며 LDL-콜레스테롤 농도와는 역상관 관계를 유지하고 있다. 동맥경화증은 여러 가지 원인에 의하여 유발되는 매우 복잡한 질병으로 그 병리발생의 원인과 기전에 대하여는 여전히 분명치 못한 점이 많이 있지만 본 실험에서 시료농도의 증가에 따라 HDL-콜레스테롤 농도가 더 많은 증가를 나타냈는데, 특히 0.25%급여군의 경우 대조군에 비하여 약 73%이상 증가되었으며 HDL-C/TC의 비도 역시 유의적으로 증가되었다. 또한 동맥경화 발병 위험을 나타내는 동맥경화지수는 시료 급여 수준에 따라 많이 감소됨으로서 지방저하 뿐만 아니라 나아가서 동맥경화증에 대한 상당한

예방 및 치료효과를 기대할 수 있다.

Table 28. Serum concentrations of LDL- and HDL- cholesterol, HDL-C/TC and AI in rats fed high cholesterol diet

Group ¹⁾	LDL-cholesterol Concentration(mg/dL)	HDL-cholesterol Concentration(mg/dL)	HDL-C/TC ²⁾	AI ³⁾
Normal	61.13±29.79 ^{a)}	59.37±6.44 ^{a)}	0.46±0.42 ^{a)}	1.17
Control	316.34±33.24 ^{b)}	29.13±8.65 ^{b)}	0.13±0.17 ^{b)}	8.37
E- I	87.76±28.49 ^{a)}	31.09±4.95 ^{c)}	0.24±0.30 ^{c)}	3.12
E- II	92.66±16.69 ^{a)}	50.42±7.51 ^{a)}	0.33±0.43 ^{c)}	1.99

1) See the legend of Table 1.

2) HDL-C/TC=HDL-cholesterol/total cholesterol

3) AI(Atherosclerotic index) =(total chol. - HDL chol.)/ HDL chol.

4) Mean±S.E. (n=10).

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

(4) 혈청 킬로미크론-, VLDL-, LDL-콜레스테롤, VLDL/HDL과 LDL/HDL-콜레스테롤

시료와 고콜레스테롤식이를 흰쥐에 6주간 급여시 혈청 중 킬로미크론-, VLDL-, LDL-콜레스테롤, VLDL/HDL과 LDL/HDL-콜레스테롤의 비율은 표 29와 같다.

킬로미크론 함량은 고콜레스테롤 식이로 인하여 정상군에 비하여 많은 증가를 나타냈으나 시료모두 유의적인 감소를 나타내었다. 시료에 의한 혈청 콜레스테롤 농도 저하 효과는 소장외 콜레스테롤 합성이나 킬로미크론을 구성하는 아포지단백 때문인 것으로 보고되고 있다. VLDL-콜레스테롤 농도는 시료급여시 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소되었는데 이는 고지방·고콜레스테롤 식이에서 셀루로오스가 VLDL-콜레스테롤 농도를 증가시켰다는 보고와 상반된 결과이며, 특히 시료급여군의 경우 정상군의 함량에 근접하였다. VLDL/HDL-콜레스테롤 비율은 시료에 의하여 유의적인 감소를 나타내지 않았으나 LDL/HDL-콜레스테롤의 비율은 대조군에 비하여 뚜렷하게 감소되었다.

Table 29. Serum concentrations of chylomicron, VLDL, LDL-cholesterol, and VLDL/HDL and LDL/HDL-cholesterol in rats fed high cholesterol diet

Group	Chylomicron-C (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	VLDL/HDL-C	LDL/HDL-C
Normal	13.94 ± 2.40 ^{a)}	22.45 ± 4.86 ^{a)}	61.13 ± 9.79 ^{a)}	0.38	1.03
Control	83.47 ± 12.17 ^{b)}	53.51 ± 8.59 ^{b)}	316.34 ± 33.24 ^{b)}	0.55	3.26
E1	45.58 ± 4.56 ^{c)}	20.27 ± 2.07 ^{a)}	87.76 ± 8.49 ^{c)}	0.65	1.74
E2	61.90 ± 9.31 ^{c)}	26.26 ± 4.73 ^{a)}	92.66 ± 16.69 ^{c)}	0.52	1.84

1) See the legend of Table 1.

2) Mean ± S.E. (n=10).

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