

아미노酸的 種類에 따라 *Saccharomyces cerevisiae* 가 生成하는 香氣의 變化

申 鉉 垆 · 安 炳 學

韓國科學技術院 生物工程研究室

Aroma Produced by *Saccharomyces cerevisiae* Using Various Amino Acids

Hyun-Kyung Shin and Byung-Hak Ahn

Bioprocess Laboratory, Korea Advanced
Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(1985년 9월 2일 수리)

Abstract

Several interesting aromas could be produced from the cultures of *Saccharomyces cerevisiae* depending on the amino acids used as sole nitrogen source. The yeast produced a fusel oil odor in leucine-medium, an aroma of traditional Korean rice wine in aspartic acid-medium and a floral note in phenylalanine-medium, respectively. Ethanol, iso-amyl alcohol, iso-butanol and n-propanol were found as major volatile constituents in all the above three cultures. In addition to these compounds, phenethyl alcohol was present as major volatiles both in the aroma concentrates of the phenylalanine and aspartic acid cultures, and phenethyl acetate only in the phenylalanine culture.

서 론

효모, 곰팡이, 세균등 미생물은 그 대사산물로서 여러가지 휘발성 방향성분을 생성하고 있다.

*Saccharomyces*¹⁾나 *Hansenula*²⁾속등의 효모는 주류제품의 향기나 과일향등을 다양하게 생성할 수 있는 것으로 보고되어 있고, *Aspergillus*³⁾, *Penicillium*⁴⁾, *Ceratocystis*⁵⁾, *Trametes*⁶⁾, *Mycoacia*⁷⁾, *Trichoderma*⁸⁾, *Osmoporus*⁹⁾속의 곰팡이들은 치즈, 바나나, 꿀, 레몬, 아니스, 테르펜, 정유 및 장미향등 다양한 향기 성분을 생성하는

것으로 알려져 있으며, 세균으로서 *Streptococcus*¹⁰⁾, *Lactobacillus*¹⁰⁾, *Micrococci*¹¹⁾, *Pseudomonas*¹¹⁾속등이 유가공품과 육가공품의 향기성분이나 과일향 또는 카보닐 화합물을 생성할 수 있는 것으로 보고되어 있다.

본 연구에서는 양조 및 제빵에 널리 사용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 배지 조성중 아미노산을 비롯한 질소원을 변경시킬 경우 배양액의 향기 또는 냄새의 변화를 조사하고 아울러 생성된 휘발성 화합물의 주된 성분을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

한국과학기술원에서 보존하고 있는 제빵효모 *Saccharomyces cerevisiae* Y-3 균주를 분양받아 시험용 균주로 사용하였다.

2. 배지조성 및 배양조건

방향의 생성을 위한 기본 배지의 조성은 Table 1과 같고 질소원으로 첨가된 아미노산은 모두 L-형을 사용하였다.

탄소원과 질소원을 혼합하여 살균할 경우 Mail-lard 반응에 의해 휘발성 화합물이 생성되는 것을 피하기 위해서 질소원을 분리하여 살균한 후 무균적으로 혼합하여 사용하였다. 배양은 500ml 플라스크에 배지 150ml씩 분주한 다음 24시간 전 배양한 액 1ml을 접종하여 30°C의 왕복진탕배양기(진동수 100회/분, 진동폭 7cm)에서 배양하였다.

3. 배양액의 관능검사

상기와 같이 질소원이 다른 배지에 1~3일간 배

Table 1. Composition of meeiausee

Glucose	90g
Nitrogen source ¹⁾	2.5~5g
Citrate buffer ²⁾	50ml
Salt solution ³⁾	100ml
Vitamin solution ⁴⁾	100ml
Distilled water	750ml

- 1) Asparagine, Histidine, NH₄Cl 2.5g
Other amino acids 5g
- 2) Citrate buffer pH 5.3
K-citrate 100g
Citric acid 20g
Distilled water 1000ml
- 3) Salt solution
KH₂PO₄ 5.5g
KCl 4.5g
CaCl₂·2H₂O 1.3g
MgSO₄·7H₂O 1.3g
FeCl₃·6H₂O 25mg
MnSO₄·4H₂O 25mg
Distilled water 1000ml
- 4) Vitamin solution
Thiamin HCl 25mg
Inositol 1.3g
Nicotinamide 125mg
Ca-pantothenate 75mg
Pyridoxin HCl 13mg
Biotin 13mg
Distilled water 1000ml

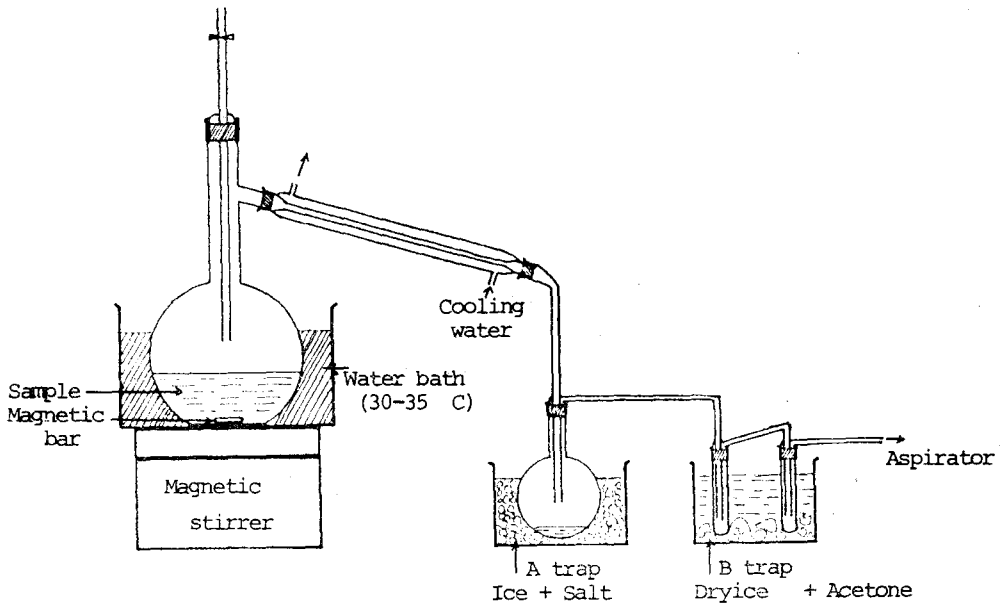


Fig. 1. Apparatus for collecting volatiles from the culture broth of *S. cerevisiae*.

양한 다음 과기원 생물공학부의 남자연구원 8명과 여자연구원 5명으로 구성된 panel로 하여금 면전을 열고 충분히 냄새를 맡은후 냄새의 종류와 강도를 기술하도록 하여 빈도가 높게 지적된 2가지 정도의 냄새를 순서대로 표시하였다.

4. 방향성분의 추출 및 분석

방향성분의 포집은 48시간동안 배양한 시료액으로부터 Fig. 1과 같은 감압증류장치를 사용하여 실시하였다. 즉, 30~35°C의 항온조에서 시료에 동량의 증류수를 가하고 magnetic bar로 교반시키면서 2시간동안 증류하면서 증류분은 얼음과 소금의 A trap으로 1차 통과시킨후 이어서 dry ice 및 acetone의 B trap을 통과시킴으로써 휘발성화합물을 응축, 포집하였다. A 및 B trap에 포집된 응축액을 혼합한 후 동량의 포화식염수를 가하고 동량의 ether로 3회 추출하여 합하였다. Ether추출물을 상온에서 감압회전농축기로 서서히 농축한 후 최종적으로 질소가스를 흘려 ether를 완전히 제거하여 GC분석용 시료로 사용하였다. GC에 의한 분석을 위하여 Varian aerograph model 3700을 사용하였으며 이때 GC의 분석조건은 다음과 같다.

Detector: Flame ionization detector
Column: 10'x1/8" o.d., stainless steel

Stationary phase: 5% Carbowax 20M
on 80~100Mesh Chromosorb W-AW
Flow rate of carrier gas(N₂) : 20ml/min
Column temperature: Held at 40°C for 2min
and then programmed at 6°C/min to 230°C
Injector temperature: 250°C
Detector temperature : 250°C

크로마토그램에서 분리된 피크는 표준물질의 머무름시간(retention time)과 비교하여 잠정적으로 동정하였다.

결과 및 고찰

1. 향기의 생성

예비실험 결과 탄소원에 따라서는 배양중 생성하는 냄새에 큰 차이가 나타나지 않아 포도당을 탄소원으로 고정하고 질소원으로 여러종류의 아미노산과 염화암모늄을 첨가하여 배양시키면서 배양 2일째에 각 배양액의 냄새를 관능적으로 조사하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다. 표에서 볼 수 있는 바와 같이 대체적으로 알코올취를 바탕으로 탁주, 약주, 청주, 과일주, 식빵, 간장등 다양한 냄새를 발산하는 것으로 밝혀졌다.

*S. cerevisiae*는 alanine 배지에서 탁주와 과일

Table 2. Effect of nitrogen source on the aromas produced in the culture broths of *Saccharomyces cerevisiae*

Nitrogen source	Aroma produced	
	Nature	Intensity*
Alanine	rice wine, fruit wine	##
Asparagine	loaf bread, fruit	##
Aspartic acid	rice wine, sake	###
Histidine	loaf bread, walnut	+
Isoleucine	sake, fusel oil	##
Leucine	fusel oil, fruit	###
Methionine	soy sauce, rotten egg	##
Phenylalanine	flower, fruit	##
Threonine	loaf bread, yakju	+
Tyrosine	rice wine, yakju	##
Casamino acid	rice wine, sake	##
NH ₄ Cl	rotten egg, sake	##

Tested at 48 hr-incubation

*+ Weak ## Strong ### Very strong

주, asparagine 배지에서 식빵과 과일, aspartic acid 배지에서는 탁주와 청주, 그리고 histidine 배지에서는 식빵과 호도의 냄새를 생성하였다. Isoleucine 과 leucine 배지에서는 휴젤유취와 청주 또는 과일향을 나타내었고, methionine의 경우 간장향과 부패계란의 복합적인 냄새를 발산하였다. 그리고 phenylalanine 배지는 강퍽한 꽃향기 또는 과일향기로 표현될수 있는 방향을 생성하였고, 무기질소인 열화암모늄 시험구에서는 부패계란과 청주의 복합적인 냄새를 나타내는등 질소원의 종류에 따라 매우 다양한 냄새를 생성하는 것으로 조사되었다.

한편 배양기간에 따라 냄새의 변화를 조사해 본 결과 배양 1일에는 냄새는 약하지만 탁주, 약주, 꽃향기, 과일향기, 간장냄새등 비교적 흥미있고 단순하게 느껴지는 향기가 많이 생성되었으나 발효가 진행됨에 따라 점차 냄새가 강해지면서 3일 이후에는 탁주, 과일주, 과일향기 이외에 부패 과일등 복잡한 냄새를 발산하는 것으로 나타났다. Phenylalanine의 경우 배양 1일에는 꽃향기를 나타내고 2일에는 꽃향기 및 과일향을 나타내다가 배양 3일에는 과일 부패취 및 과일주의 냄새를 나타내었다. 이는 일차적으로 생성된 화합물들이 서로 화학적 반응을 일으키거나 또는 이들 생성화합물들이 기질이되어 효모에 의해 제 2의 화합물로 변화함으로써 여러화합물의 혼합물이 생성되어 다양하고 복합적인 느낌의 냄새를 발산하는 것으로 생각된다.

제빵이나 알코올 발효에서 산업적으로 널리 이용되고 있는 *S. cerevisiae*에서 배지중 간단히 아미노산 종류만 변화시켜도 생성된 향기가 이상과 같이 다양하게 변화한 것으로 비추어 본 연구를 다각적으로 진행시킨다면 발효제품의 품질개선 및 제품다양화에 유익한 결과를 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

이상의 결과로부터 전통적인 탁주향기를 나타내는 aspartic acid, 휴젤유취와 과일향을 복합적으로 나타내는 leucine 배지 및 꽃향기를 발산하는 phenylalanine 배지를 흥미있는 배지로 선택하여 휘발성 화합물을 분석하였다.

2. 휘발성 화합물의 분석

질소원으로 aspartic acid, leucine 또는 phenylalanine을 각각 첨가한 배양액으로부터 휘발성 화합물을 분리한 다음 에테르로 추출한 후 농축한

시료액을 GC로 분리하여 Fig. 2와 같은 크로마토그램을 얻었다.

그림에서 보던 세 시험구에서 모두 ethanol이 다량 생성된 이외에 leucine 배지에서는 iso-amyl alcohol이 주된 성분으로 밝혀졌고 n-propanol과 iso-butanol이 미량 생성되어 있으며, aspartic acid 배지에서는 상당량의 iso-amyl alcohol 이외에 iso-butanol, n-propanol 및 phenethyl alcohol이 생성되어 있음을 알 수 있다. 그리고 phenylalanine배지에서는 phenethyl alcohol이 다량 생성되었고 아울러 iso-amyl alcohol, phenethyl acetate, iso-butanol 및 n-propanol이 상당량 생성된 것을 볼 수 있다.

Leucine배지에서 iso-amyl alcohol이 현저히 많이 생성된 것은 아미노산이 풍부한 배지에서는 먼저 transamination에 의해 α -keto acid가 생성되고 이의 탈탄산 및 환원반응에 의해서 각 아미노산에 상응하는 알코홀이 생성된다는 Ehrlich경로에 의해서 leucine으로부터 α -keto isocaproate를 거쳐서 iso-amyl alcohol이 생성된다는 보고¹²⁻¹³⁾와 잘 일치하고 있다. 그러나 aspartic acid나 phenylalanine배지에서도 iso-amyl alcohol이 상당량 생성되었는데 이들은 포도당으로부터 pyruvate를 거쳐서 합성된¹⁾ 것으로 생각된다. Phenylalanine의 경우 phenethyl alcohol은 역시 Ehrlich경로에 의해서 합성된 것으로 추정되며 phenethyl acetate는 phenethyl alcohol에 acetic acid나 acetyl-CoA가 작용하여 합성¹⁴⁾된 것으로 생각된다. 한편 aspartic acid배지에서도 phenethyl alcohol이 생성된 것을 볼 수 있는데 이는 포도당으로부터 phenylalanine이 생합성되는 과정에 aspartic acid가 질소 공여체로 작용하여 phenylalanine을 합성하고 이로부터 상기와 같이 phenethyl alcohol이 생성된 것으로 추정된다.

Phenylalanine배지에서 강한 꽃향기를 나타낸 것은 phenethyl alcohol과 phenethyl acetate의 영향¹⁵⁾이 큰 것으로 생각되며 aspartic acid나 leucine배지에서의 탁주향이나 과일 또는 휴젤유취는 iso-amyl alcohol, n-propanol 및 iso-butanol의 상대적인 함유량 차이와 크로마토그램에서는 나타나지 않았지만 휘발성이 강하여 추출 또는 농축과정에서 제거되었을 가능성이 높은 여러 종류의 ester나 aldehyde의 종류 또는 함량의 차이에 기인하였을 것으로 추정된다.

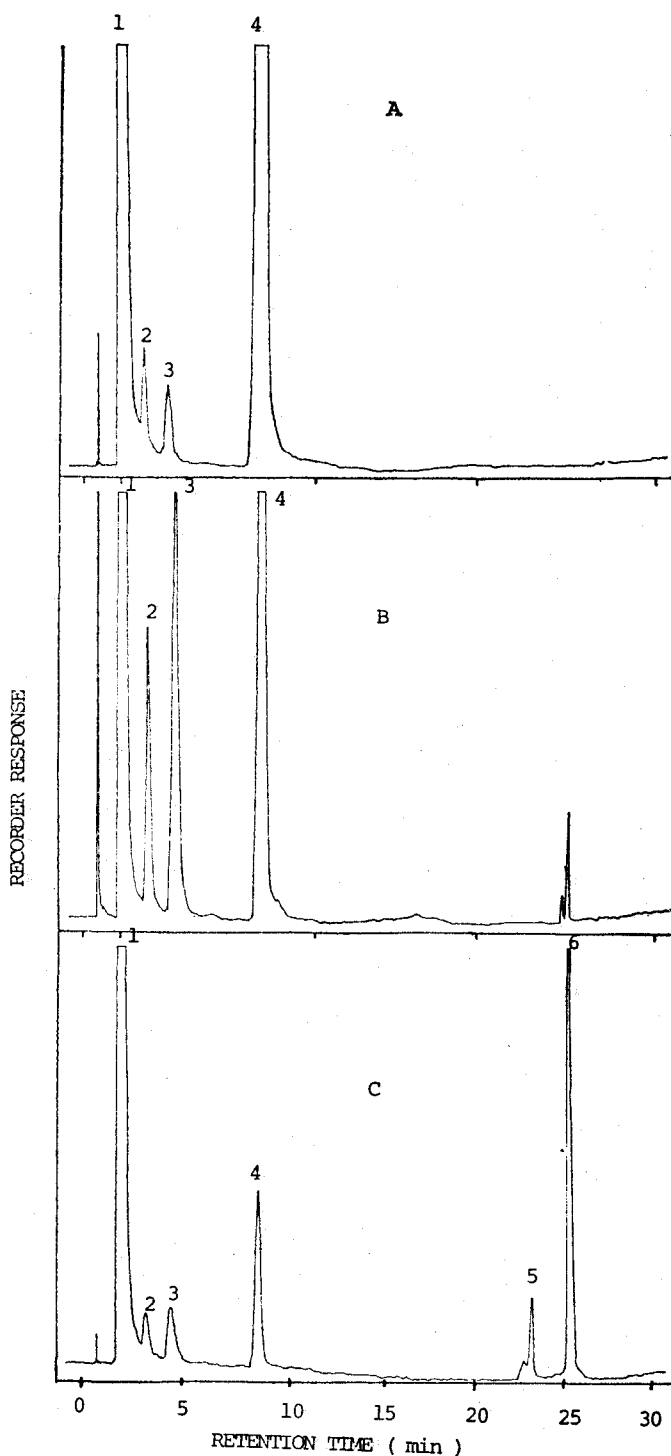


Fig. 2. Gas chromatograms of the concentrated extracts from the leucine(A), aspartic acid(B) and phenylalanine(C) cultures of *S. cerevisiae*.
1. Ethanol 2. n-Propanol 3. Iso-butanol 4. Iso-amyl alcohol
5. Phenethyl acetate 6. Phenethyl alcohol.

초 록

*Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 합성배지중 질소원을 변화시키면서 생성된 향기성분을 조사한 결과 아미노산에 따라서 향기의 변화가 크게 나타났으며 특히 aspartic acid 배지는 전통적인 탁주향기, leucine배지는 휴젤유취 그리고 phenylalanine배지는 꽃향기등 흥미있는 향기를 발산하였다. 이들 배양액의 휘발성 화합물을 GC를 사용하여 분석한 결과 ethanol, iso-amyl alcohol, n-propanol이 주된 성분으로 밝혀졌으며 이외에 aspartic acid 배지에서는 phenethyl alcohol이 그리고 phenylalanine배지에서는 상당량의 phenethyl alcohol과 phenethyl acetate가 검출되었다.

참 고 문 헌

1. Suomalainen, H. and Lehtonen, M.: J. Inst. Brew., 85 : 149(1979).
2. Koizumi, K., Kakuta, K., Kodama, K. and Nojiro K.: Nippon Nogeikagaku Kaishi, 56 : 757, (1982).
3. Haruo, T. and Yataro, O.: Agr. Biol. Chem., 33 : 147(1969).
4. Nelson, J.H.: J. Agr. Food Chem., 18 : 567 (1979).
5. Collins, R.P. and Halim, A.F.: Lloydia, 33 : 481(1970).
6. Halim, A.F. and Collins, R.P.: Lloydia, 34 : 451(1971).
7. Halim, A.F. and Collins, R.P.: Lloydia, 38 : 87(1975).
8. Sastry, K.S.M., et. al.: Indian Perfumer, XXII : 302(1978).
9. Sastry, K.S.M., et al.: Indian J.Exp. Biol., 18 : 836(1980).
10. Marshall, M.: Perfumer & Flavorist, 7 : 27(1982).
11. Haymon, L.W. and Acton, J.C.: In "Lipids as a Source of Flavor" (Suparms, M.K., ed), American Chemical Society, Washington, D.C. (1978).
12. Ouchi, K., et. al.: J. Ferment. Technol., 58 : 301(1980).
13. Ingraham, J.L. and Guyman, J.F.: Arch. Biochem. Biopsy., 88 : 157(1960).
14. Yoshizawa, K. and Hashimoto, N.: Agr. Biol. Chem., 45 : 2183~2190(1981). "Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeasts".
15. Heath, H.B.: In "Flavor Technology" pp. 211~367, AVI publishing Co., Inc., Westport, Connecticut (1978).